



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Nutrition

présentée et soutenue publiquement par

Cécile FAURE

le 17 décembre 2010

Intérêt de la citrulline dans la prise en charge du sujet âgé dénutri :

Etudes expérimentale et clinique

Directeur de thèse : **Christian AUSSEL**

Co-encadrement de la thèse : **Christophe MOINARD**

Jury

Mr. Luc CYNOBER , Professeur, Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique, Université Paris Descartes	Président du jury
Mme. Pauline COTI-BERTRAND , Praticien hospitalier, Unité de Nutrition Clinique, CHU Vaudois, Lausanne	Rapporteur
Mr. Stéphane SCHNEIDER , Professeur, Service de Gastro-Entérologie et Hépatologie, CHU de Nice	Rapporteur
Mme. Christelle GUILLET , Maître de conférences, Faculté de Médecine, Clermont-Fd	Examineur
Mr. Christophe MOINARD , Maître de conférences, Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique, Université Paris Descartes	Examineur
Mr. Christian AUSSEL , Praticien hospitalier, Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique, Université Paris Descartes	Examineur

AgroParisTech
Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique
Université Paris Descartes
4, avenue de l'observatoire
75270 PARIS cedex 06

A mes parents,

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique (EA 4466), Faculté de Pharmacie, Université Paris-Descartes, en collaboration avec le laboratoire de Nutrition humaine de Clermont Ferrand, la plate-forme de protéomique de l'Institut Cochin et les Hôpitaux Charles Foix, Albert Chenevier, Emile Roux, Raymond Poincaré et Bichat Claude Bernard (AP-HP).

REMERCIEMENTS

A Monsieur Le Lous et à la Fondation Le Lous, qui de par son financement m'a permis de réaliser ce doctorat. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir assuré un suivi de qualité, à travers les comités de thèse, les journées de la Fondation Le Lous et les formations dispensées chez Viva Santé,

A Messieurs Guillaume Olive et Thomas Breuzet, pour leur sympathie et l'accompagnement formateur et enrichissant qu'ils m'ont tous deux apporté au cours de ces 3 années,

A Monsieur le Professeur Luc Cynober, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de doctorat au sein de son laboratoire, pour sa rigueur scientifique et son encadrement très enrichissant,

A Monsieur le Docteur Christian Aussel, que j'ai eu la chance d'avoir comme directeur de thèse. Dès le début, je m'en suis rendue compte et encore maintenant, je le redis : je n'aurais pu mieux tomber ! Merci Christian de votre soutien,

A Madame le Docteur Agathe Raynaud-Simon, qui m'a également toujours soutenue et aidée, pour son implication dans CIPROAGE,

A Monsieur le Docteur Christophe Moinard, pour ses compétences scientifiques ainsi que ses qualités d'écoute, très appréciables,

A Madame le Docteur Valérie Nivet-Antoine, pour l'excellent duo que nous formions pour CIPROAGE, mais aussi pour ta disponibilité, les bons moments que nous avons passés ensemble, et la confiance que tu me témoignes,

A Madame Servane Le Plenier, pour ses qualités scientifiques, sa rigueur, son encadrement enrichissant,

A Messieurs les Docteurs Stéphane Walrand, Philippe Chafey, Arnaud Ferry et Mesdames les Docteurs Valérie Daugé, Béatrice Morio-Liondore et Anne-Judith Waligora qui ont contribué au développement de la partie expérimentale de ma thèse et à ma formation scientifique,

A Messieurs les Docteurs Jean-Pascal De Bandt, Philippe Noirez et Mesdames les Docteurs Sylviane Darquy, Cécile Loï, Florence Moussaoui et Nathalie Neveux, pour leur disponibilité, leurs conseils et leur sympathie,

A Michèle, le tourbillon du LBN ! Merci de ton efficacité et ta gentillesse,

A Séphora, qui a remplacé Michèle avec brillo et efficacité, merci de ton dévouement, ta sympathie et ton dynamisme,

A Mirjam, pour son chaleureux accueil au sein du LBN, ses grandes qualités humaines,

A Sandra, que j'ai eue le plaisir de découvrir à Florence lors du 30ème congrès de l'ESPEN, avec mes promenades plus qu'agitées en fauteuil roulant et la rencontre de Juan Carlos, mémorables,

A Caroline, pour l'aide qu'elle m'a apportée, pour son dévouement, son efficacité et son sérieux,

A Gaby et Djamel, déjà des "poilus" à mon arrivée au labo et qui m'ont fait bénéficier de leurs expériences diverses,

A Charlotte, pour, entre autre, notre baignade nocturne à Nice,

A Julie, pour les bons moments que nous avons passés ensemble,

A Benoît, mon stagiaire, pour m'avoir aidée avec mes western blots,

A Hervé, pour son agréable compagnie aussi bien au labo qu'en tant que voisin. Toujours prêt à proposer son aide, merci pour le coup de main avec mes broyages de cerveaux,

A Eva, pour son agréable compagnie et pour les bons moments passés ensemble au cours de la dernière ligne droite,

A Eliane et Laure, pour leur sympathie,

Aux Docteurs et Professeurs Olivier Bouillane, Christine Forasassi, Sylvie Meaume, Elèna Paillaud, Jean-Claude Melchior, qui ont participé activement et avec intérêt aux inclusions des sujets de CIPROAGE au sein de leur service,

Aux Professeur et Docteurs Daniel Tomé, Claire Gaudichon, Jean-François Huneau et François Mariotti, qui m'ont initiée à la nutrition et m'ont donné goût à la recherche,

A l'Institut APPERT, qui a contribué à la réalisation des études de protéomique,

A mes parents et à mon frère, qui m'ont toujours soutenue et ont été à mes côtés dans les moments difficiles. Les mots sont insuffisants pour vous témoigner tout l'amour que je vous porte,

A Amélie, Gary, Sophia, Julie, Ben, Dora, Arnaud, Pauline, Laurène, Kik, Adrien et biens d'autres encore...

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction</i>	<i>- 6 -</i>
<i>Données Bibliographiques</i>	<i>- 10 -</i>
<i>1. Modifications du métabolisme protéique de la personne âgée</i>	<i>- 11 -</i>
1.1 Le métabolisme protéique chez la personne âgée	- 11 -
1.1.1 Modifications dues à l'âge	- 11 -
1.1.2 Variations de la synthèse protéique suivant les compartiments corporels	- 13 -
1.1.3. Facteurs altérant la stimulation de la synthèse protéique corps entier	- 15 -
1.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme protéique	- 16 -
1.2.1. La régulation par le niveau d'apport protéique	- 17 -
1.2.2. La régulation au cours des différents états nutritionnels	- 18 -
1.2.3. La voie de transduction mTOR	- 21 -
1.3. Conséquences des modifications du métabolisme protéique et relation avec la fonction musculaire	- 22 -
1.3.1. Sarcopénie	- 23 -
1.3.2. Dynapénie	- 24 -
<i>2. Stratégies nutritionnelles pour lutter contre la dénutrition</i>	<i>- 26 -</i>
2.1. Les acides aminés	- 26 -
2.1.1. La leucine	- 27 -
2.1.2. La citrulline	- 29 -
2. 2. Les protéines alimentaires	- 36 -
2.2.1. Aspect quantitatif	- 36 -
2.2.2. Aspect qualitatif	- 37 -
2.3. La chrononutrition	- 38 -
2.4. Stratégies nutritionnelles et exercice physique	- 40 -
<i>Objectif du Travail.....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>Publications Originales</i>	<i>- 45 -</i>

1. Partie expérimentale	- 46 -
1.1. Présentation de la publication n°1	- 46 -
1.1.1. Résumé	- 47 -
1.1.2. Matériel et méthodes.....	- 48 -
1.1.3. Résultats principaux.....	- 50 -
1.1.4. Conclusion	- 51 -
1.2. Présentation de la publication n°2	- 80 -
1.2.1. Résumé	- 81 -
1.2.2. Matériel et méthodes.....	- 82 -
1.2.3. Résultats principaux.....	- 83 -
1.2.4. Conclusion	- 84 -
2. Partie clinique.....	- 117 -
2.1. Résumé	- 118 -
2.2. Introduction.....	- 119 -
2.3. Méthodologie	- 119 -
2.4. Etat des lieux.....	- 122 -
Discussion Générale.....	- 124 -
Conclusions et Perspectives	- 133 -
Références Bibliographiques	- 135 -
Liste des Figures.....	- 153 -
Liste des Tableaux.....	- 157 -
Liste des Abréviations.....	- 159 -
Annexe	- 161 -

INTRODUCTION

Avec près de 15 millions de personnes de plus de 60 ans en France et 5 millions de plus de 75 ans, la population des seniors ne cesse de s'accroître. Ainsi, d'après l'Institut National des Statistiques et des Etudes Economiques (INSEE, 2005), la proportion des plus de 60 ans passera de 21% en 2005 à 35% en 2050, et le nombre de personnes de plus de 75 ans doublera au cours de cette même période. Par ailleurs, l'espérance de vie en 2050 devrait être de 84 ans pour les Hommes et de 89 ans pour les femmes (INSEE, 2005). Le vieillissement de la population s'accompagne d'une plus grande fréquence de pathologies aiguës et chroniques et de perte d'autonomie.

Au cours du vieillissement, de nombreuses fonctions sont altérées, avec notamment une atteinte spécifique de la fonction musculaire. Ces altérations sont la conséquence de modifications de la composition corporelle et ont un retentissement majeur sur la santé et la qualité de vie des personnes âgées (Smoliner *et al.*, 2008). Le muscle squelettique est particulièrement touché, avec une diminution de la masse et de la force musculaires. La diminution de masse musculaire n'étant pas à elle seule responsable de la diminution de force musculaire, deux termes distincts les désignent : ainsi, on appelle sarcopénie, la fonte musculaire (Muscaritoli *et al.*, 2010) et dynapénie, la perte de force (Fujita & Volpi, 2006; Clark & Manini, 2008; Muscaritoli *et al.*, 2010). Leurs conséquences sur l'organisme sont multiples : faiblesse, fatigabilité, risque accru de chutes et de fractures, perte d'autonomie, moindre résistance aux épisodes cataboliques...

Ce processus lié au vieillissement est majoré par la dénutrition qui constitue un facteur aggravant de morbi-mortalité (Kikafunda & Lukwago, 2005; Oliveira *et al.*, 2009; Muscaritoli *et al.*, 2010). La dénutrition protéino-énergétique concerne 5 à 10% de cette population vivant à domicile, ce qui représente 450 000 personnes âgées de plus de 70 ans en France. Cette prévalence augmente de façon considérable en cas d'institutionnalisation (15 à 38%) et

d'hospitalisation (40 à 70%) (Kagansky *et al.*, 2005; HAS, 2007). La dénutrition protéino-énergétique des personnes âgées influence considérablement la survenue de pathologies et leur évolution (Giner *et al.*, 1996; Hébuterne & Schneider, 2000; Kagansky *et al.*, 2005) ; elle contribue à la surmorbidity de cette population et donc au surcoût des dépenses de santé. Ainsi, l'amélioration de l'état nutritionnel de la personne âgée apparaît-elle comme une priorité de santé publique.

Des recherches sur des stratégies nutritionnelles ou l'utilisation de nutriments spécifiques visant à prévenir ou à limiter la dénutrition et/ou la sarcopénie sont en cours de développement. Parmi les stratégies nutritionnelles proposées, nous nous sommes intéressés à la citrulline (Cit). Ainsi, il a été montré récemment qu'un régime enrichi en Cit permet d'augmenter l'accrétion protéique musculaire *via* une stimulation de la protéosynthèse chez des rats âgés dénutris (Osowska *et al.*, 2006). Des travaux *in vitro* montrent que son action sur la protéosynthèse musculaire est directe (Moinard *et al.*, 2007a). Enfin, ces résultats ont également été retrouvés chez l'Homme car Jourdan et coll. (2008) ont montré que la Cit stimule la synthèse protéique musculaire chez des jeunes adultes sains.

Au cours de ce travail, afin de déterminer les effets d'une complémentation en Cit, nous avons mené d'une part une étude expérimentale chez des rats âgés et, d'autre part, mis en place une étude clinique chez des sujets âgés dénutris hospitalisés.

Sur le plan expérimental, nous avons tout d'abord évalué l'effet d'un apport en Cit sur la masse et la fonction musculaires de rats âgés dénutris (publication n°1). L'objectif de la deuxième étude visait à déterminer les modifications métaboliques induites par la Cit, afin de préciser les mécanismes d'action qui conduisent à une augmentation de la synthèse protéique (publication n°2).

Dans une deuxième partie, nous détaillerons l'étude clinique CIPROAGE qui a pour but d'évaluer les effets d'une complémentation en Cit sur divers paramètres du métabolisme protéique et sur la composition corporelle des personnes âgées dénutries hospitalisées.

Enfin, dans une dernière partie, les résultats de ces études seront discutés dans leur globalité puis des perspectives en seront dégagées.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MODIFICATIONS DU METABOLISME PROTEIQUE DE LA PERSONNE AGEE

Le métabolisme protéique de la personne âgée est modifié en comparaison à celui de sujets plus jeunes (Nair, 1995). Ces modifications peuvent avoir un retentissement clinique majeur.

Chez le sujet jeune sain, la synthèse protéique et la protéolyse, qui constituent le renouvellement protéique, sont en équilibre, ce qui permet d'assurer l'homéostasie protéique (Nair, 1995). Par ailleurs, une synthèse protéique supérieure à la protéolyse entraîne un gain protéique net et, *a contrario*, une protéolyse supérieure à la synthèse est associée à une diminution de la masse protéique. La synthèse protéique se fait à partir d'un *pool* d'AAs libres issus essentiellement de la voie de la protéolyse (75% des AAs utilisés pour la synthèse protéique sont issus de la protéolyse, les 25% restant étant apportés par l'alimentation). D'autres voies interviennent dans le métabolisme protéique, telles que la dégradation irréversible des AAs (oxydation des AAs avec une élimination de CO₂ et d'azote *via* le cycle de l'urée) et les apports protéiques alimentaires qui permettent de compenser les pertes d'AAs (figure 1) (Beaufrère, 2002).

1.1 Le métabolisme protéique chez la personne âgée

1.1.1 Modifications dues à l'âge

Chez la personne âgée, la balance entre synthèse et dégradation protéique, est déséquilibrée en faveur de la seconde, ce qui entraîne une perte régulière de protéines. La

principale différence entre sujets âgés et jeunes adultes résiderait surtout au niveau de la stimulation post-prandiale de la synthèse protéique qui est plus faible chez le sujet âgé (Nair, 1995; Volpi *et al.*, 1998) (figure 2). Il existe un défaut de la stimulation anabolique chez le sujet âgé. Cette résistance à la stimulation postprandiale de la synthèse protéique pourrait expliquer en partie la perte des protéines musculaires au cours du vieillissement. Chez l'Homme âgé, l'effet stimulant du repas sur la synthèse protéique musculaire est diminué (Nair, 1995; Volpi *et al.*, 1998).

Les premières études concernant les effets du vieillissement sur la dégradation protéique ont tout d'abord montré une diminution de la vitesse de dégradation protéique corps entier en période post-absorptive, survenant avec l'âge (Balagopal *et al.*, 1997b). Des défauts de régulation de certaines voies protéolytiques (voies ubiquitine-protéasome-dépendante et lysosomale) ont été rapportés chez le sujet âgé (Martinez-Vicente *et al.*, 2005; Vernace *et al.*, 2007) et des études récentes montrent que l'effet inhibiteur du repas sur les voies de la protéolyse musculaire est moindre chez les rats âgés. Ainsi, différentes études expérimentales montrent que les rats âgés ne répondraient plus correctement aux signaux anti-cataboliques de l'insuline et des AAs (Capel *et al.*, 2009; Combaret *et al.*, 2009).

A la protéolyse viennent s'ajouter des phénomènes d'oxydation et de carbonylation des protéines qui augmentent avec l'âge, ce qui affecte leur métabolisme et leur fonctionnalité (Ugarte *et al.*, 2009; Combaret *et al.*, 2009) et contribue à la perte de la masse protéique (Mosoni *et al.*, 2004).

Au niveau musculaire, malgré une protéolyse musculaire augmentée en période post-prandiale chez le sujet âgé et des réactions d'oxydation et de carbonylation des protéines accrues,

c'est essentiellement la diminution de la synthèse protéique qui explique la perte de masse et de protéines musculaires survenant au cours du vieillissement (voir 1.1.2 et 1.1.3.).

1.1.2 Variations de la synthèse protéique suivant les compartiments corporels

Des variations du métabolisme protéique ont été constatées suivant les compartiments protéiques considérés. Cependant, nous limiterons notre analyse à la synthèse protéique aux niveaux corps entier, musculaire et splanchnique (intestins et foie).

1.1.2.1. Au niveau corps entier

Le renouvellement protéique total exprimé par kg de poids corporel, diminue chez l'Homme au cours du vieillissement (Welle *et al.*, 1993; Boirie *et al.*, 1997; Morais *et al.*, 1997; Millward *et al.*, 1997), la vitesse de synthèse protéique de l'organisme devenant plus faible chez la personne âgée. Cependant, la composition corporelle étant profondément modifiée avec l'âge, si l'on ajuste les mesures de protéosynthèse aux changements de masse maigre, il apparaît alors que la différence observée entre sujets jeunes et âgés s'estompe voire disparaît (Robert *et al.*, 1984; Boirie *et al.*, 1997; Morais *et al.*, 1997; Arnal *et al.*, 2000b).

Il est toutefois difficile de conclure quant au mode d'expression le plus pertinent. La masse maigre étant diminuée chez les personnes âgées, lorsque la protéosynthèse est rapportée à celle-ci, la diminution absolue de la protéosynthèse est masquée; de plus, selon ce mode d'expression, les résultats ne rapportent pas réellement la mesure au niveau du corps entier.

1.1.2.2. Au niveau musculaire

On retrouve chez l'Homme, une diminution de la synthèse protéique spécifiquement musculaire avec l'âge (Balagopal *et al.*, 1997b). En effet, le taux de synthèse basale de l'ensemble des protéines du *vastus lateralis* est inférieur de 39 % chez des sujets âgés de plus de 60 ans, par rapport à celui des adultes de moins de 24 ans (Yarasheski *et al.*, 1993).

Cette diminution de synthèse protéique musculaire toucherait préférentiellement les protéines myofibrillaires (Welle *et al.*, 1993; Nair, 1995) et mitochondriales (Rooyackers *et al.*, 1996; Balagopal *et al.*, 1997b) et n'aurait aucune répercussion sur les protéines sarcoplasmiques (Balagopal *et al.*, 1997b) (figure 3). La synthèse absolue des protéines myofibrillaires diminuerait de 44 % chez les sujets âgés comparativement à celle de sujets adultes (Welle *et al.*, 1993). Cette altération porte essentiellement sur la synthèse des chaînes lourdes de myosine (Balagopal *et al.*, 1997b; Toth & Tchernof, 2006).

La diminution du renouvellement des protéines contractiles a des conséquences fonctionnelles et pourrait expliquer, en partie, les pertes de masse et de force musculaires observées au cours du vieillissement (Toth & Tchernof, 2006).

1.1.2.3. Au niveau splanchnique

L'ingestion de protéines entraîne une hyperaminoacidémie post-prandiale qui stimule la synthèse protéique musculaire, car la disponibilité en AAs est un des éléments clés de la régulation de la synthèse protéique musculaire. Avant de rejoindre la circulation systémique et d'être utilisés pour les synthèses protéiques, une partie des AAs d'origine alimentaire est captée par le foie. On appelle extraction splanchnique des AAs, la part des AAs de l'alimentation qui est utilisée par l'intestin et le foie ou qui est définitivement oxydée. Ce phénomène d'extraction splanchnique concerne environ 50% des AAs absorbés (à l'exception des AAs à chaîne ramifiée,

dont l'extraction est d'environ 20%) (Elwyn *et al.*, 1968). Il permet à l'aminoacidémie de rester dans des limites raisonnables quelle que soit la charge protéique alimentaire.

L'extraction splanchnique des AAs augmente fortement avec l'âge (Morais *et al.*, 1997) et ce processus est appelé séquestration splanchnique : les études menées chez l'Homme (Boirie *et al.*, 1997; Volpi *et al.*, 1999) montrent que celles de la Leu (leucine) et de la phénylalanine est deux fois plus élevée chez les sujets âgés que chez les sujets adultes (figure 4). Les AAs sont donc moins disponibles pour les territoires périphériques comme le muscle, comme le montrent Boirie et coll. (1997) : il existe une corrélation inverse entre séquestration splanchnique et la concentration plasmatique de Leu (figure 5). Ceci expliquerait la moindre stimulation postprandiale de la synthèse protéique musculaire, retrouvée chez la personne âgée (Walrand *et al.*, 2000).

1.1.3. Facteurs altérant la stimulation de la synthèse protéique corps entier

Lorsque les stimulations habituelles de la synthèse protéique (exercice, repas, insuline, AAs, renutrition) sont modérées, l'organisme du sujet âgé présente une réduction de ses capacités de réponse à ces stimulations (Dardevet *et al.*, 2000), résultant en un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce déséquilibre (Greenlund & Nair, 2003) :

- la diminution de la sécrétion d'hormones anabolisantes (l'hormone de croissance (GH), l'*insulin-like growth factor-I* (IGF-I), la testostérone) ou le développement d'une résistance à ces hormones (insuline) (Copeland *et al.*, 1990; Vermeulen *et al.*, 1999). Les glucocorticoïdes, qui sont des hormones catabolisantes, sont sécrétés en excès chez le rat âgé et participent à la fonte musculaire (Dardevet *et al.*, 1995; Attaix *et al.*, 2005). L'existence d'une altération de la

sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire au rétrocontrôle des glucocorticoïdes chez le rat âgé a été proposée par Sapolsky et coll. (1986). De plus, les glucocorticoïdes altèrent la protéosynthèse plus intensément chez les rats âgés en raison d'une forte insulino-résistance (Grizard *et al.*, 2001).

- des facteurs nutritionnels, tels que la diminution des apports en énergie ou en AAs (Paddon-Jones *et al.*, 2008). Toutefois, il semble que la stimulation de la synthèse protéique par l'augmentation de l'aminocidémie soit conservée au cours du vieillissement (Mosoni *et al.*, 1993), (voir 1.2.2.2) ;
- une moindre récupération après des épisodes cataboliques répétés. Les cytokines pro-inflammatoires produites accélèrent les processus cataboliques (Zoico & Roubenoff, 2002), diminuent les synthèses protéiques et augmentent l'apoptose (Yasuhara *et al.*, 2000).
- la diminution de l'activité physique et de son effet anabolisant (Muscaritoli *et al.*, 2010).

La réponse anabolique à des stimulations (exercice, insuline, protéines, AAs) plus intenses semble toutefois maintenue chez la personne âgée (Dardevet *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2006; Koopman & van Loon, 2009; Liu & Latham, 2009). De plus, une étude réalisée chez la personne âgée en bonne santé montre que la vasodilatation améliore l'effet de l'insuline sur l'anabolisme protéique musculaire (Timmerman *et al.*, 2010).

1.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme protéique

La régulation du métabolisme protéique fait intervenir simultanément deux niveaux d'action, l'un hormonal, l'autre nutritionnel, qui agissent en synergie dans des conditions

physiologiques. Nous ne développerons ici que la régulation nutritionnelle du métabolisme protéique :

- la régulation par le niveau d'apport protéique;
- la régulation selon les différents états nutritionnels (i.e. post-prandial et post-absorptif).

1.2.1. La régulation par le niveau d'apport protéique

L'effet de l'apport azoté sur le métabolisme protéique a été étudié au niveau musculaire chez l'Homme. Les AAs et notamment les AAs essentiels (AAE) (en particulier les AAs à chaîne ramifiée) sont des stimulateurs de la synthèse protéique musculaire (Volpi *et al.*, 2003), qui sans affecter la protéolyse, induisent un bilan net positif (Volpi *et al.*, 1998; Boirie *et al.*, 2005). Leur effet anabolique est conservé chez la personne âgée, particulièrement pour la Leu, qui permet l'initiation de la traduction des ARNm au niveau musculaire (Fujita & Volpi, 2006). Une étude a comparé les effets d'une complémentation en Leu chez des rats adultes ou âgés. Chez le rat âgé, on retrouve une moindre stimulation de la synthèse protéique après un repas additionné d'alanine (contrôle iso-azoté au groupe complémenté en Leu) par rapport à des rats adultes. Lorsque le régime de ces rats âgés est additionné de Leu, la synthèse protéique est restaurée au même niveau que celle de rats plus jeunes (Dardevet *et al.*, 2002).

Cependant, de faibles doses d'AAE ou de Leu ne permettent pas d'augmenter la synthèse protéique de rats ou de personnes âgés autant que chez les jeunes ; ceci révèle le développement d'une résistance à l'effet de la Leu et des AAs avec l'âge (Dardevet *et al.*, 2000; Guillet *et al.*, 2004a). Cette résistance à l'effet des AAs chez les personnes âgées, retrouvée notamment lors d'apports modérés en protéines ou en AAs, résulte en une stimulation limitée de la synthèse protéique comparativement aux sujets jeunes (Volpi *et al.*, 2000).

1.2.2. La régulation au cours des différents états nutritionnels

L'état post-prandial correspond à la période pendant laquelle des nutriments ingérés arrivent du tube digestif dans la circulation. Selon le type de nutriments, il dure entre 3 et 8 heures après un repas. L'état post-absorptif correspond aux 12 à 18 heures suivant l'état post-prandial, c'est-à-dire généralement le matin à jeun.

A l'état post-absorptif, peu de modifications du métabolisme protéique ont été observées entre sujets jeunes et âgés (Volpi *et al.*, 2001). Les modifications observées chez les personnes âgées résulteraient donc surtout d'un dysfonctionnement à l'état post-prandial.

1.2.2.1. A l'état post-absorptif

A l'état post-absorptif, la synthèse, la protéolyse et l'oxydation sont à leur niveau basal ; la protéolyse étant légèrement supérieure à la synthèse, l'organisme est donc en bilan négatif. Ce niveau basal de renouvellement protéique dépend des apports protéiques des jours précédents, le muscle étant alors un producteur net d'AAs (Beaufrère, 1994).

La plupart des études ne montre pas de modification des activités des principales voies du métabolisme protéique à l'état basal chez le sujet âgé, tant au niveau corps entier (figure 6a) (Boirie *et al.*, 1997) qu'au niveau musculaire (figure 6b) (Volpi *et al.*, 2001). Cependant, d'autres études réalisées chez l'Homme (Welle *et al.*, 1993; Balagopal *et al.*, 1997b) montrent que la synthèse protéique de protéines myofibrillaires à l'état post-absorptif décline avec l'âge. Volpi *et coll.* (2001) ont trouvé une légère augmentation de la protéolyse musculaire à l'état post-absorptif chez le sujet âgé par rapport aux adultes ; au contraire, d'autres études ont trouvé une diminution de la protéolyse musculaire à l'état post-absorptif chez la personne âgée (Rennie *et al.*, 2010). Ces incohérences de la littérature sont liées à des problèmes méthodologiques, inhérents aux

techniques isotopiques qui supposent que le sujet est en état stable au moment de l'exploration (Pencharz & Ball, 2003).

1.2.2.2. A l'état post-prandial

A l'état post-prandial, l'organisme est en bilan azoté positif par des mécanismes liés à la fois à l'apport en substrats et à l'augmentation de l'insulinémie. Chez l'adulte, la vitesse de synthèse protéique du muscle squelettique est augmentée en période post-prandiale et la disponibilité en acides aminés est un des facteurs clés de sa régulation (Rennie *et al.*, 1982). Une inhibition de la dégradation protéique musculaire a également été rapportée chez l'adulte sain en réponse à l'augmentation de l'insulinémie retrouvée en période post-prandiale (Rennie, 2005; Kumar *et al.*, 2009). En réalité, on ne connaît toujours pas la contribution exacte de la protéosynthèse et celle de la protéolyse à la positivisation du bilan protéique en période post-prandiale.

Il semble que l'effet inhibiteur du repas sur la protéolyse – aussi bien corps entier que musculaire – soit réduit chez le sujet âgé (Boirie *et al.*, 1997; Arnal *et al.*, 1999). Le défaut d'inhibition post-prandiale de la protéolyse musculaire chez des rats âgés résulte d'une altération de la voie protéasome-ubiquitine dépendante (Combaret *et al.*, 2005). Cette moindre réponse pourrait provenir d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Boirie *et al.*, 2001a) et aux AAs (Combaret *et al.*, 2005). En ce qui concerne la stimulation de la protéosynthèse musculaire, différentes études ont mis en évidence chez le rat âgé une réduction de l'effet stimulateur de la prise alimentaire (voir figure 2 p12) (Mosoni *et al.*, 1995; Volpi *et al.*, 1998). L'anabolisme postprandial ne permettrait plus alors de compenser la perte protéique post-absorptive et cela pourrait se traduire par une lente érosion du capital protéique.

La répartition des apports protéiques sur la journée intervient également dans la régulation nutritionnelle du métabolisme protéique chez la personne âgée. L'anabolisme protéique pourrait ainsi être stimulé par une augmentation de la disponibilité périphérique en AAs en modifiant le rythme circadien de l'apport azoté (Arnal *et al.*, 1999; Arnal *et al.*, 2000a). En effet, plusieurs études montrent que l'ingestion de 80 % des apports protéiques au cours d'un repas augmente la masse cellulaire active chez la femme âgée, comparativement à un apport étalé sur la journée (Arnal *et al.*, 1999; Bouillanne *et al.*, 2009) (voir 2.3).

La prise alimentaire induit une élévation de l'insulinémie (Prod'homme *et al.*, 2004). Il s'agit d'une hormone puissamment anabolisante sur le muscle et qui agit sur le métabolisme protéique à différents niveaux : transport des AAs dans les cellules, protéosynthèse et protéolyse. L'effet de l'insuline sur la synthèse protéique reste encore controversé. En effet, différentes études réalisées *in vitro* montrent une action stimulante de l'insuline sur l'incorporation des AAs au sein d'un muscle isolé. Cependant, ces résultats ont rarement été retrouvés *in vivo*, - ou uniquement chez l'animal très jeune - (Gelfand & Barrett, 1987) sans un apport conséquent en AAs (Fukagawa *et al.*, 1985). Il est ainsi difficile d'attribuer les effets observés à l'insuline seule. Le principal effet de l'insuline sur l'anabolisme protéique résulterait de son action inhibitrice sur la protéolyse (Fukagawa *et al.*, 1985; Gelfand & Barrett, 1987; Biolo & Wolfe, 1993), qui semble maintenue dans une certaine mesure, chez la personne âgée (Boirie *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'insulinorésistance pourrait également affecter les capacités de réponse anabolique du muscle âgé (Boirie *et al.*, 2005). L'effet de l'insuline sur la stimulation de la synthèse protéique musculaire est diminué chez le rat âgé par rapport aux rats adultes (Dardevet *et al.*, 1994). Chez l'Homme âgé sain, la réponse anabolique du muscle à une augmentation postprandiale de l'insulinémie et de l'aminocidémie est altérée, indiquant une perte de contrôle de l'action anabolique de

l'insuline sur le muscle âgé (Volpi *et al.*, 2000; Guillet *et al.*, 2004a). Enfin, une augmentation supraphysiologique de l'insulinémie permettrait de stimuler l'anabolisme protéique du muscle squelettique chez les personnes âgées (Fujita *et al.*, 2009).

Ces différences de réponse chez la personne âgée pourraient être expliquées par des modifications des voies de transduction de la synthèse protéique, et en particulier de la voie mTOR.

1.2.3. La voie de transduction mTOR

La régulation de la synthèse protéique dépend de la constitution d'un complexe constitué – entre autre – de facteurs protéiques d'initiation de la traduction (*eukaryotic initiation factors*, eIFs). Ce complexe permet le positionnement du ribosome sur les ARN messagers. La formation de ce complexe est elle-même sous le contrôle d'interactions enzymatiques, faisant intervenir la voie de transduction mTOR qui induit la stimulation de la synthèse protéique par deux mécanismes (figure 7) (Anthony *et al.*, 2000) :

- d'une part, le complexe protéique mTOR activé induit la phosphorylation de la p70S6 kinase, qui une fois activée, phosphoryle la protéine S6 ribosomale, cette dernière activant l'initiation de la traduction protéique ;
- d'autre part, l'activation de mTOR permet la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 qui libère eIF4E, celle-ci activant l'initiation de la traduction (Fujita & Volpi, 2006).

Le complexe protéique mTOR est activé par différents signaux dont la stimulation électrique musculaire (Parkington *et al.*, 2003), l'insuline et les AAs (Beugnet *et al.*, 2003; Kimball & Jefferson, 2006; Fujita *et al.*, 2007), tels que la Leu (Tzankoff & Norris, 1977; Kimball & Jefferson, 2006) et la Cit (Moinard *et al.*, 2007b). Chez la personne âgée, l'activation de mTOR est diminuée en réponse aux *stimuli* habituels (Dardevet *et al.*, 2000; Funai *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2009).

1.3. Conséquences des modifications du métabolisme protéique et relation avec la fonction musculaire

L'altération du métabolisme protéique trouvée chez la personne âgée contribue de façon significative à la diminution progressive et involontaire de la masse musculaire, dite sarcopénie. Par ailleurs, différents facteurs contribuent à aggraver cette sarcopénie :

- En cas de perte de poids, il est observé une diminution préférentielle de la masse musculaire chez la personne et le rat âgés, témoignant d'une mauvaise adaptation à la dénutrition (Chambon-Savanovitch *et al.*, 1999; Felgines *et al.*, 1999; Hébuterne *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2002) (figure 8).

- La dénutrition protéino-énergétique, fréquente chez le sujet âgé, participe à l'aggravation de la sarcopénie.

- Enfin, les personnes âgées présentent une résistance à la renutrition par rapport aux adultes jeunes (Shizgal *et al.*, 1992; Hébuterne *et al.*, 1997; Mosoni *et al.*, 1999; Walrand *et al.*, 2000), ce qui fait que toute perte de masse maigre est quasi-définitive.

Les altérations du métabolisme des protéines participent ainsi à l'ensemble des processus physiologiques et pathologiques contribuant à la diminution de la masse musculaire. La réduction de la masse musculaire s'accompagne, le plus souvent, d'une diminution de la force musculaire appelée dynapénie (Fujita & Volpi, 2006; Clark & Manini, 2008; Muscaritoli *et al.*, 2010). L'altération de la fonction musculaire qui en résulte contribue à la perte d'autonomie des personnes âgées (troubles de la marche, restriction d'activité...).

1.3.1. Sarcopénie

Plusieurs études transversales (Tzankoff & Norris, 1977; Cohn *et al.*, 1980; Butler-Browne & Bigard, 2006) et quelques études longitudinales (Forbes & Reina, 1970; Gallagher *et al.*, 2000) ont montré la diminution de la masse maigre au cours du vieillissement ; elle est accompagnée d'une augmentation de la masse grasse (Beaufrère & Morio, 2000; Manini *et al.*, 2009). De façon générale, le vieillissement s'accompagne de profondes modifications de la composition corporelle et l'accumulation de masse grasse retrouvée chez le sujet âgé induirait une forte augmentation de la concentration plasmatique en leptine par rapport aux sujets jeunes (Monroe *et al.*, 2000). Ainsi, il a été proposé que l'effet satiétogène de la leptine contribuerait ensuite à la diminution des apports protéino-énergétiques des personnes âgées (Raynaud-Simon, 2009).

La sarcopénie résulte d'interactions complexes entre de multiples facteurs (figure 9) (Greenlund & Nair, 2003). La diminution des apports protéiques et énergétiques, de l'activité physique (Giner *et al.*, 1996; Muscaritoli *et al.*, 2010), de la sécrétion de nombreuses hormones anabolisantes (i.e. insuline, GH, l'IGF-I, testostérone) et l'augmentation concomitante de celle d'hormones catabolisantes (i.e., glucocorticoïdes) pénalisent les synthèses protéiques et contribue

à la perte de masse maigre (i.e. sarcopénie) et à l'altération des performances musculaires (Proctor *et al.*, 1998; Greenlund & Nair, 2003).

Le vieillissement s'accompagne non seulement d'une perte quantitative de masse musculaire mais aussi d'une modification qualitative des fonctions musculaires qui semble liée à des altérations de la composition en myosine des fibres musculaires (Manini *et al.*, 2009).

La fonte musculaire observée au cours du vieillissement est due à une diminution de la synthèse des protéines musculaires à l'état post-prandial chez les personnes âgées en comparaison à des sujets plus jeunes. Elle est caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires (Denis & Chatard, 1994). L'atrophie des fibres musculaires induite par le vieillissement est associée à une augmentation des inclusions lipidiques (Delmonico *et al.*, 2009) et de l'infiltration de tissu conjonctif (Kent-Braun *et al.*, 2000; Koopman & van Loon, 2009) (figure 10) et n'affecte pas de la même manière tous les types de fibres : les fibres rapides de type II sont davantage touchées par les effets du vieillissement, avec une baisse de 20 à 60 % de leur diamètre (tableau 1) (Lexell *et al.*, 1988; Larsson *et al.*, 1997; Hikida *et al.*, 2000; Butler-Browne & Bigard, 2006).

1.3.2. Dynapénie

La première traduction de la perte de masse musculaire est une altération des propriétés fonctionnelles du muscle.

Au cours du vieillissement, la force des muscles squelettiques diminue. En effet, la force musculaire est à son apogée entre 20 et 30 ans, reste stable pendant 10 à 20 ans puis décline de 12 à 15% par décade après 40-50 ans (Hurley, 1995). Tous les modes de contraction

musculaire (Vandervoort, 2002) sont altérés avec l'âge (Lynch *et al.*, 1999; Izquierdo *et al.*, 1999).

Certaines études montrent une évolution parallèle de la diminution de la force et de la masse musculaires (Frontera *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 2003). Cependant, cette corrélation n'a pas été retrouvée dans d'autres études (Goodpaster *et al.*, 2006; Beliaeff *et al.*, 2008; Rolland & Vellas, 2009), ce qui montre que d'autres facteurs (i.e., neurologiques et musculaires) interviennent aussi et peuvent expliquer la baisse importante de force chez le sujet âgé (Clark & Manini, 2008; Rolland & Vellas, 2009). L'altération de la force musculaire du sujet âgé est plus importante que la perte de masse musculaire pour expliquer le déclin des performances fonctionnelles musculaires (Rolland & Vellas, 2009).

De nombreuses données montrent bien l'effet bénéfique de l'activité physique sur la masse et les fonctions musculaires des personnes âgées. Toutefois, la compliance à l'activité physique reste faible (Bonney *et al.*, 2003; Liu & Latham, 2009). Ainsi, les stratégies nutritionnelles se placent comme une alternative ou complémentaire à une activité physique dans ce contexte. Nous développerons donc dans une deuxième partie les différentes stratégies nutritionnelles qui ont été étudiées afin de limiter la perte protéique observée au cours du vieillissement.

2. STRATEGIES NUTRITIONNELLES POUR LUTTER CONTRE LA DENUTRITION

Parmi les différentes stratégies nutritionnelles mises en œuvre pour lutter contre la dénutrition des personnes âgées, nous avons retenu la complémentation en certains acides aminés tels que la Leu et la Cit, la qualité des protéines et le moment de leur ingestion dans la journée (chrononutrition) ainsi que la pratique d'une activité physique couplée à une stratégie nutritionnelle.

2.1. Les acides aminés

Malgré la perte protéique musculaire observée au cours du vieillissement, le muscle âgé conserve de façon variable sa capacité de réponse aux stimulations induisant une synthèse protéique musculaire (exercice, repas, insuline, AAs, renutrition) (Mosoni *et al.*, 1993; Fujita & Volpi, 2006). Les acides aminés essentiels (AAE) (Paddon-Jones *et al.*, 2006) et en particulier ceux à chaîne ramifiée sont connus pour leur effet stimulateur de la synthèse protéique musculaire. Il a même été montré qu'une administration orale d'un bolus d'AAE permettait de restaurer la synthèse protéique de sujets âgés au même niveau que celle de sujets jeunes (Paddon-Jones *et al.*, 2004). Cependant la quantité d'AAE administrés n'est pas sans importance puisque de plus faibles doses (7 g) ne permettent pas de restaurer l'accrétion protéique au même niveau que celui de sujets plus jeunes (Volpi *et al.*, 2000; Guillet *et al.*, 2004a; Katsanos *et al.*, 2005).

Les études menées dans ce contexte ont été particulièrement convaincantes pour la Leu (Fujita & Volpi, 2006) et pour la Cit (Osowska *et al.*, 2006). Des effets anaboliques ou anti-

cataboliques – quoique moins marqués – ont également été montrés pour la glutamine, l'arginine (Arg) et leur précurseur, l'ornithine (Orn) sous forme de sel d'alpha-cétoglutarate (De Bandt & Cynober, 1998). Baier et coll. (2009) ont également montré récemment qu'un apport nutritionnel de β -hydroxy- β -methylbutyrate, L-Arg et L-lysine sur une durée d'1 an, permettait d'augmenter significativement la masse maigre et la synthèse protéique chez des personnes âgées. Plusieurs études (Kimball & Jefferson, 2006; Proud, 2007) indiquent que l'effet anabolique de ces AAs serait médié *via* une activation de la voie de transduction mTOR.

2.1.1. La leucine

La Leu, outre son rôle de substrat de la synthèse protéique, est aussi un nutriment potentiel de signalisation qui régule le métabolisme protéique.

L'effet stimulateur de la Leu sur la synthèse protéique musculaire se fait *via* la stimulation de la voie de transduction de mTOR (Anthony *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2007). Parmi les AAs à chaînes ramifiées, la Leu est le seul acide aminé induisant une phosphorylation des protéines sur la voie de signalisation en aval de mTOR, à savoir 4E-BP1, S6K et eIF4E chez le rat à jeun depuis 18h (Anthony *et al.*, 2000). 4E-BP1 phosphorylée libère eIF4E qui forme un complexe avec eIF4G afin d'initier la traduction des ARNm.

La Leu est connue pour ses propriétés stimulatrices de la synthèse protéique musculaire chez les personnes âgées (figure 11) (Fujita & Volpi, 2006; Rieu *et al.*, 2006). L'effet de la Leu sur la synthèse protéique musculaire, serait dû à une action directe sur l'initiation de la traduction des ARN (Dardevet *et al.*, 2000; Fujita & Volpi, 2006).

Cet effet est atténué avec l'âge mais, apportée en excès, la Leu pourrait corriger la résistance à la renutrition retrouvée chez la personne âgée et ainsi augmenter la vitesse de synthèse protéique musculaire (Fujita & Volpi, 2006; Katsanos *et al.*, 2006). Dardevet et coll. (2000) ont montré qu'une concentration en Leu deux fois supérieure au niveau post-prandial usuel était nécessaire afin de retrouver chez le rat âgé une stimulation de la synthèse protéique identique à celle de rats plus jeunes. Le même résultat est obtenu au niveau de la phosphorylation de p70S6 kinase, ce qui suggère fortement que la résistance à l'action de l'insuline est située au niveau de la signalisation du message anabolique. En effet, un régime apportant un mélange d'AAE comprenant différentes concentrations de Leu (41 vs 26%) permet d'augmenter similairement la vitesse de synthèse protéique fractionnaire (FSR) chez les sujets jeunes mais cet effet est uniquement retrouvé pour la concentration la plus élevée de Leu (41%) chez les sujets âgés (Katsanos *et al.*, 2006) (figure 12). Ainsi, des apports importants de Leu permettraient d'augmenter la disponibilité de Leu au niveau musculaire et donc de maintenir la stimulation post-prandiale de la synthèse protéique (Dardevet *et al.*, 2000; Dardevet *et al.*, 2002).

Bien que la Leu stimule la synthèse des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires chez le rat âgé, cet effet n'est pas retrouvé pour la synthèse des chaînes lourdes de la myosine (Guillet *et al.*, 2004). De plus, une étude récente réalisée chez des personnes âgées montre qu'une complémentation en Leu à long terme a des effets bénéfiques sur la synthèse protéique musculaire mais n'a aucun impact sur la masse ni la force musculaire (Verhoeven *et al.*, 2009). De même, une complémentation en Leu à long terme n'aurait aucun effet bénéfique sur la composition corporelle aussi bien chez le rat âgé (Rieu *et al.*, 2007) que chez l'Homme âgé (Verhoeven *et al.*, 2009), malgré une stimulation de la synthèse protéique postprandiale avérée.

Ces résultats décevants posent la question de l'intérêt de l'utilisation de la Leu en pratique clinique.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inhibition de la protéolyse à l'état post-prandial est défectueuse au niveau du muscle âgé (Arnal *et al.*, 2002). Combaret et coll. (2005) ont montré que la Leu permettait de restaurer l'inhibition de la protéolyse dépendante du protéasome chez des rats âgés.

Une étude récente a par ailleurs montré que le défaut de stimulation de la synthèse protéique musculaire par la Leu chez le rat âgé pouvait être restauré grâce à un apport en antioxydants, indépendamment de la disponibilité en Leu (Marzani *et al.*, 2008). De plus, les antioxydants (rutine, vitamine E, vitamine A, zinc et selenium) accentueraient l'effet de la Leu sur l'inhibition post-prandiale de la protéolyse musculaire chez le rat âgé (Marzani *et al.*, 2008).

Cependant, bien que la Leu stimule la synthèse protéique en situation post-prandiale, les études de la littérature n'ont mis en évidence aucun bénéfice en terme de gain protéique (Rieu *et al.*, 2007; Marzani *et al.*, 2008 ; Zeanandin *et al.*, 2009). Ce travail vient d'être très récemment confirmé chez l'adulte par le groupe de Volpi (Glynn *et al.*, 2010). Il conviendrait de vérifier ces observations chez le sujet âgé. Cependant, les données disponibles dans la littérature ne permettent pas d'expliquer ce résultat paradoxal, qui, toutefois est reproductible d'une étude à l'autre.

2.1.2. La citrulline

La Cit est un AA qui, pendant très longtemps, a été peu étudié par les nutritionnistes car il n'entre pas dans la composition des protéines et est peu présent dans l'alimentation (Curis *et al.*, 2005). On trouve la Cit en particulier dans la pastèque à des concentrations variant de 0,7 à 3,6

mg/g de fruit frais ; elle y joue un rôle d'anti-oxydant majeur (Akashi *et al.*, 2001; Rimando & Perkins-Veazie, 2005). Chez l'Homme, la citrullinémie est variable selon la population considérée : elle est de l'ordre de 40 μ M pour les populations caucasiennes (Crenn *et al.*, 2000; Crenn *et al.*, 2003; Curis *et al.*, 2005), concentration deux fois plus élevée que celle observée dans une population chinoise (17 μ M) (Jianfeng *et al.*, 2005). Ceci s'expliquerait par des différences de terrain génétique et/ou d'habitudes alimentaires entre ces populations, et non par la méthode de dosage. Chez le jeune rat, la citrullinémie se situe entre 69 et 85 μ M (Hartman *et al.*, 1994) et elle augmenterait avec l'âge (Mistry *et al.*, 2002).

2.1.2.1. Métabolisme de la Cit

Le métabolisme de la Cit implique 3 enzymes clés : la \bullet NO synthase (NOs) et l'ornithine carbamoyl transférase (OCT) qui permettent la production de Cit ; l'argininosuccinate synthase (ASS) qui la convertit en argininosuccinate. La distribution de ces enzymes au niveau tissulaire permet de distinguer trois voies métaboliques différentes pour la Cit : aux niveaux de l'intestin, du rein et du foie. Dans la plupart des tissus produisant du monoxyde d'azote (\bullet NO), la Cit est recyclée en arginine (Arg) par l'ASS et l'argininosuccinate lyase (ASL), ce qui augmente la disponibilité en Arg pour la production de \bullet NO (Wakabayashi Y., 2004; Curis *et al.*, 2005).

2.1.2.2. Métabolisme inter-organe

La distribution tissu-spécifique de ces enzymes va permettre de définir un métabolisme inter-organe (figure 13). Cependant, dans cette partie, nous ne détaillerons pas le métabolisme de la Cit lié au \bullet NO.

Il est maintenant admis que ce métabolisme inter-organe Arg-Cit-Arg joue un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme pour le maintien de l'homéostasie azotée en situation de carence protéique. La Cit jouerait ainsi un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie azotée (Osowska *et al.*, 2004; Moinard & Cynober, 2007).

En effet, l'absorption intestinale des AAs n'est pas limitante : elle est de 95 à 99% dans une très large gamme d'apports protéiques. Un apport en Arg ou en glutamine (Gln) résulte en une libération de Cit par l'intestin grêle. Il existe un contrôle en fonction de la disponibilité en substrat. La synthèse de Cit à partir d'Arg se fait au niveau des entérocytes par le biais de l'arginase et de l'OCT, alors que les enzymes impliquées dans le catabolisme de la Cit (ASS et argininosuccinate lyase (ASL)) ont une faible activité au niveau intestinal à l'âge adulte. La Cit est donc ensuite libérée dans la circulation portale.

En situation d'apports protéiques supérieurs aux besoins azotés, l'Arg alimentaire stimule sa propre dégradation ainsi que celle des autres AAs, permettant d'éviter l'accumulation d'AAs au niveau systémique, qui est potentiellement neurotoxique. Cependant, en situation d'apports hypoprotéiques, ce système pourrait s'avérer très rapidement délétère. Il existe un second point de contrôle particulièrement actif chez le sujet soumis à un régime hypoprotéique : il s'agit de l'expression intestinale de l'arginase et de l'OCT (Curis *et al.*, 2005). En effet, selon les travaux de Wraight et Hoogenraad (1988), la synthèse de Cit serait sensible aux variations des apports protéiques : l'activité enzymatique de l'OCT intestinale est augmentée chez des rats recevant un régime hypoprotéique, ce qui suggère que cette enzyme serait une étape limitante de ce carrefour métabolique. Toutefois, des travaux réalisés par notre équipe (Ventura *et al.*, 2007) ont montré l'implication de deux autres enzymes de ce carrefour métabolique intestinal, i.e. l'OAT et l'arginase, sans retrouver d'effet au niveau de l'OCT. Ainsi, dans une situation de restriction protéique, l'intestin libérerait préférentiellement de la Cit à la place de l'Arg, car la Cit n'est pas

captée par le foie (Windmueller & Spaeth, 1981) et pourrait ainsi limiter l'activation de l'uréogénèse hépatique.

En effet, le site de contrôle de la disponibilité en azote est le foie qui épure physiologiquement environ 50% de l'azote apporté par l'alimentation (Cynober & Marcollet, 1994). La capacité du foie à éliminer l'excès d'azote est, en partie, régulée par le flux portal d'Arg, cet AA étant un activateur de la N-acétylglutamate synthétase ; le N-acétyl-glutamate ainsi synthétisé est un activateur allostérique de la carbamoyl phosphate synthase (Cynober *et al.*, 1995) enzyme clé du cycle de l'urée. La Cit est un intermédiaire métabolique du cycle de l'urée et contribue à l'élimination de l'ammonium, toxique pour l'organisme en trop grande quantité (Rodwell, 1999a). En effet, la Cit est synthétisée au niveau du foie par l'OCT, puis métabolisée par l'ASS pour la production d'urée. Au niveau de la mitochondrie, l'ammonium est converti en carbamoyl-phosphate, réaction catalysée par la carbamoyl-phosphate synthase. Le carbamoyl-phosphate se combine avec l'Orn issue de l'Arg et reforme alors de la Cit en présence d'OCT. Enfin, l'ammonium est dégradé en urée par l'action de l'arginase, ce qui permet la régénération d'Orn (Rodwell, 1999b). Il est important de noter que le métabolisme hépatique de la Cit est strictement compartimenté et qu'il n'y a pas d'échange avec le métabolisme inter-organe de la Cit, du moins en situation physiologique.

L'Arg est ensuite resynthétisée par les reins qui possèdent les deux enzymes nécessaires. Ce processus permettrait donc d'adapter le flux de l'uréogénèse en fonction de l'apport protéique, tout en préservant l'homéostasie de l'Arg. Cette voie métabolique est un moyen de protéger l'Arg alimentaire d'une dégradation excessive au niveau du foie. 75% de la Cit produite par l'intestin

est captée par le rein. L'ASS et l'ASL permettent la conversion de la Cit en Arg au niveau rénal (Deutz, 2008).

2.1.2.3. Actions pharmacologiques de la citrulline

- *Effets du malate de citrulline*

Le malate de Cit est un médicament commercialisé sous le nom de Stimol®, (Biocodex, France) et prescrit pour le traitement de l'asthénie. L'apport oral quotidien de malate de Cit est de 6 g, ce qui correspond à 3,4 g de Cit/jour. Ainsi, un apport de Stimol® pendant 15 jours chez des Hommes sédentaires réduit la sensation de fatigue, avec une augmentation moyenne de 34% de production d'ATP et de 20% de la régénération de phosphocréatine (source d'énergie utilisée par le tissu musculaire, tout comme l'ATP) (Bendahan *et al.*, 2002). Le malate de Cit augmente la formation d'ATP au cours d'un exercice aérobique, diminue la concentration sanguine en ammoniac et augmente la consommation d'acide lactique, ce qui entraîne une diminution de la sensation de fatigue ainsi qu'une amélioration des performances physiques (Bendahan *et al.*, 2002). Ce serait la Cit qui favoriserait la consommation de lactate alors que le malate accélérerait la clairance de l'ammoniac. Le malate de Cit est plus efficace que les effets combinés du malate et de la Cit (Bendahan *et al.*, 2002). Une étude récente a montré qu'une administration de 6 g de malate de Cit avant une course cycliste favorise l'utilisation des AAs à chaîne ramifiée pendant l'exercice et augmente la production des métabolites dérivés de l'Arg (i.e., le nitrite, la créatinine, l'ornithine et l'urée) (Sureda *et al.*, 2010). Cependant, ces études ont certaines limites méthodologiques qui en atténuent considérablement leur intérêt scientifique (en particulier l'absence de contrôle iso-azoté).

- *Effets de la citrulline sur la stimulation de la synthèse protéique*

Puisqu'elle échappe au processus de séquestration splanchnique des AAs (Osowska *et al.*, 2004), phénomène particulièrement accru chez le sujet âgé, la Cit présente un intérêt majeur par rapport aux autres AAs. En période post-prandiale, elle permettrait d'augmenter la disponibilité en azote en périphérie (Moinard & Cynober, 2007) et pourrait rétablir la stimulation de la synthèse protéique chez des sujets âgés. Plusieurs études (Osowska *et al.*, 2004; Rougé *et al.*, 2007) ont montré l'effet bénéfique d'une complémentation en Cit sur le bilan azoté. En effet, Rougé et coll. (2007) ont mis en évidence une augmentation de 57% du bilan d'azote chez 8 volontaires sains complémentés en Cit sur une journée. Ce résultat peut être expliqué par une augmentation des concentrations en Cit et Arg au niveau systémique suite à l'apport en Cit sans augmentation de l'excrétion urinaire. Cette amélioration du bilan azoté pourrait être expliquée par une augmentation de la synthèse protéique musculaire, comme observée par Osowska et coll. (2006). En effet, une étude réalisée chez des rats âgés dénutris a montré que la Cit était capable de stimuler la synthèse protéique musculaire (+80%) et d'augmenter le contenu protéique musculaire (+20%) (figure 14) (Osowska *et al.*, 2006; Moinard & Cynober, 2007). Cette donnée expérimentale a été récemment retrouvée chez l'Homme. En effet, la Cit permet aussi d'augmenter la synthèse protéique musculaire chez de jeunes adultes sains soumis auparavant à un régime hypoprotéique (Jourdan *et al.*, 2008).

De plus, la Cit a un effet direct sur la protéosynthèse musculaire (figure 15), particulièrement marqué au niveau des fractions sarcoplasmiques et myofibrillaires (Moinard *et al.*, 2007a). Les données préliminaires disponibles suggèrent que l'action anabolique de la Cit sur la synthèse musculaire résulterait d'une stimulation de la voie de transduction de mTOR : Moinard et coll. (2007b) ont montré que la Cit entraîne une augmentation du niveau de

phosphorylation de la p70S6 kinase et de la protéine S6 ribosomale qui est corrélée avec la citrullinémie chez le rat âgé dénutri (figure 16).

2.1.2.4. Pharmacocinétique et tolérance de la citrulline

Des études cliniques ont prouvé l'innocuité de la Cit chez l'Homme (Rajantie *et al.*, 1980; Waugh *et al.*, 2001) et une étude de pharmacocinétique et de tolérance à la Cit, menée chez des adultes jeunes recevant des doses orales s'étalant entre 2 et 15 g, montre qu'une administration de Cit sur une courte période était bien tolérée (Moinard *et al.*, 2008). Ainsi, 8 volontaires sains ont reçu des doses croissantes de Cit (2, 5, 10 et 15 g de Cit) en une prise unique à 15 jours d'intervalle. Les données pharmacocinétiques ont démontré que la Cit est un bon précurseur d'Arg *in vivo* mais que ce phénomène est saturable pour une dose voisine de 15 g ; d'ailleurs la Cmax d'Arg est peu différente pour une dose de 10 g ou de 15 g de Cit. Cette saturation de la capacité de transformation de la Cit en Arg, vraisemblablement rénale, s'accompagne d'une forte augmentation de l'élimination urinaire à la dose de 15 g. Par ailleurs, la tolérance de la Cit est excellente puisqu'aucun événement indésirable n'a été rapporté au cours de cette étude. Plus récemment, une étude de pharmacocinétique a été réalisée chez la personne âgée (10 g de Cit vs 9,94 g d'Arg). Les premiers résultats indiquent que la Cit est bien tolérée chez la personne âgée et sont comparables à ceux obtenus chez l'adulte (Moinard *et al.*, communication personnelle).

2. 2. Les protéines alimentaires

2.2.1. Aspect quantitatif

Si les besoins énergétiques sont réduits, parallèlement à la baisse d'activité et à la diminution de masse maigre chez les personnes âgées (Roberts *et al.*, 1992), les besoins protéiques ne diminuent pas : les apports nutritionnels conseillés sont légèrement supérieurs à ceux de l'adulte chez la personne âgée en bonne santé, soit 1 g/kg de poids par jour (vs 0,8 g/kg chez l'adulte), afin que la quantité d'azote alimentaire soit suffisante pour garantir un bilan azoté équilibré dans cette population (Campbell *et al.*, 2001; Cynober *et al.*, 2001). En situation de dénutrition, l'apport protéique devrait être augmenté à 1,3 voire 1,5 g/kg/j (HAS, 2007; Paddon-Jones *et al.*, 2008). Par ailleurs, un apport énergétique adéquat, majoritairement sous forme de glucides, est nécessaire à la bonne utilisation de ces protéines. Ainsi, il est recommandé que le rapport glucides/protides ingérés (g/j) soit supérieur à 2,5.

Un certain nombre d'études montrent l'intérêt d'augmenter des apports protéiques chez le sujet âgé afin de stimuler la protéosynthèse musculaire (Bos *et al.*, 2000; Paddon-Jones *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2009). Une méta-analyse (Milne *et al.*, 2009) publiée récemment confirme qu'une complémentation protéique permet une prise de poids chez les personnes âgées dénutries ou à risque de dénutrition, réduit le risque de mortalité chez celles qui sont dénutries et qu'elle pourrait également limiter le risque de complications.

Cependant, aucun bénéfice fonctionnel n'a été mis en évidence chez les personnes âgées ayant été complémentées en protéines (Smoliner *et al.*, 2008; Milne *et al.*, 2009). Une étude a mis en évidence un effet bénéfique des protéines de lactosérum sur la stimulation de la synthèse protéique musculaire. Cet effet était cependant moins marqué que celui obtenu avec un

complément iso-azoté d'AAE (Paddon-Jones *et al.*, 2006). Une augmentation de la synthèse protéique a également été retrouvée chez les sujets âgés, 5h après l'ingestion d'une portion de 110 g de viande rouge (figure 17) (Symons *et al.*, 2007). Cependant, si les apports protéiques alimentaires dépassent largement les apports nutritionnels conseillés (3 g/kg/j vs 1,5 g/kg/j), aucun bénéfice supplémentaire sur la synthèse protéique musculaire n'est retrouvé chez les personnes âgées (figure 18) (Walrand *et al.*, 2008).

De toute évidence les sujets âgés doivent maintenir leurs apports protéiques à un niveau suffisant afin de préserver leur masse musculaire. Cependant, la forte prévalence de l'anorexie et des problèmes de mastication, souvent rencontrés chez le sujet âgé, rendent souvent les régimes hyperprotéiques peu efficaces dans le traitement de la dénutrition de la personne âgée (Remond *et al.*, 2007).

2.2.2. Aspect qualitatif

Sur le plan qualitatif, la composition des protéines en AAs et leur digestibilité sont deux éléments clés intervenant dans l'aptitude des protéines à stimuler la synthèse protéique musculaire. En effet, toutes les protéines n'ont pas la même qualité nutritionnelle et leur valeur biologique globale dépend de la structure intrinsèque de la protéine et de sa digestibilité.

La composition en AAs d'une protéine joue un rôle déterminant. En particulier, les AAE et notamment la Leu sont un facteur clé dans la capacité d'une protéine à promouvoir l'anabolisme protéique (Volpi *et al.*, 2003; Paddon-Jones *et al.*, 2006).

Le deuxième facteur déterminant est la digestibilité de la protéine qui détermine sa biodisponibilité et influence donc la synthèse protéique musculaire postprandiale (Dangin *et al.*,

2003; Paddon-Jones *et al.*, 2005; Wilkinson *et al.*, 2007). Etant donné que la disponibilité en AAs en période post-prandiale varie selon la vitesse de digestion des protéines, il en résulte des différences d'efficacité des protéines sur la stimulation de la synthèse protéique. De multiples facteurs vont jouer sur la digestibilité des protéines (animales vs végétales, avec ou sans fibres...). Les protéines animales ont une meilleure digestibilité que les protéines végétales. La digestibilité des protéines animales atteint 93 à 100%, celle des légumineuses ou du blé entier atteint des valeurs intermédiaires de 86 à 92%, alors que d'autres légumineuses, comme les lentilles ou les haricots secs, ont une digestibilité de 70 à 85%. Ces chiffres illustrent l'effet inhibiteur des fibres sur la digestibilité des protéines alimentaires (Frénot & Vierling, 2002).

Enfin, un facteur important est le type de protéine ; on distingue en effet, les protéines dites rapides (type lactosérum) des protéines dites lentes (type caséine). Chez la personne âgée, la réponse du métabolisme protéique à la disponibilité en AAs est altérée ; il est donc nécessaire d'augmenter considérablement l'hyperaminoacidémie post-prandiale pour qu'il puisse y avoir une stimulation de la synthèse protéique. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence une stimulation de l'accrétion protéique plus efficace suite à l'ingestion de protéines rapides chez le sujet âgé, comparativement à l'ingestion de protéines lentes (figure 19) (Dangin *et al.*, 2002; Dangin *et al.*, 2003).

2.3. La chrononutrition

La chrononutrition peut se définir comme étant une modification du rythme circadien habituel de l'apport alimentaire.

Il apparaît au cours d'autres études que le moment d'ingestion des protéines au cours de la journée joue un rôle important sur la protéosynthèse. Ainsi, un apport protéique concentré sur un seul repas serait bénéfique chez le sujet âgé.

La disponibilité en AAs en période post-prandiale est un des principaux facteurs limitant de la stimulation de la synthèse protéique chez la personne âgée. Les régimes hyperprotéiques pouvant avoir des conséquences néfastes au niveau rénal, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'un apport protéique concentré sur un repas de la journée (régime pulsé) pourrait augmenter l'hyperaminoacidémie post-prandiale à un niveau suffisant pour stimuler la protéosynthèse, tout en s'affranchissant d'un effet négatif sur le rein (Arnal *et al.*, 1999).

Des études ont été réalisées afin de comparer les effets d'un régime apportant 80% des apports protéiques lors du déjeuner (apport pulsé) vs des apports protéiques répartis sur l'ensemble des repas (apport continu) (Arnal *et al.*, 1999; Arnal *et al.*, 2000a). Il a ainsi été montré qu'un apport pulsé de protéines pendant 14 jours permettait une augmentation significative du bilan azoté chez des femmes âgées en bonne santé (figure 20) (Arnal *et al.*, 1999), effet non retrouvé chez des femmes plus jeunes (Arnal *et al.*, 2000b). De même, chez des rats âgés, le régime pulsé a entraîné des modifications du métabolisme protéique (Arnal *et al.*, 2000a), avec notamment une augmentation de la synthèse protéique musculaire (Arnal *et al.*, 2002), effet qui persisterait dans le temps, même après l'arrêt du régime (Arnal *et al.*, 2000a).

Récemment, Bouillane et coll. (2009) ont réalisé une étude clinique au cours de laquelle deux groupes de patients âgés hospitalisés dénutris recevaient une alimentation contrôlée pendant 42 jours, isocalorique et isoazotée (1,3 g de protéines/kg poids/jour). Dans le groupe témoin, la ration protéique était répartie sur les 4 repas. Dans le groupe pulsé, 72% de la ration protéique étaient consommés au repas du midi. Il a ainsi été montré qu'un régime protéique pulsé

permettait d'augmenter considérablement la masse maigre et la masse musculaire squelettique appendiculaire des personnes âgées dénutries, suite à 42 jours de régime (tableau 2). Le régime protéique pulsé serait ainsi un moyen intéressant de saturer la séquestration splanchnique des AAs, en apportant en périphérie les AAs nécessaires à la synthèse protéique (Bouillanne *et al.*, 2009).

2.4. Stratégies nutritionnelles et exercice physique

Chez le sujet âgé, une activité physique de résistance importante permet d'augmenter l'accrétion protéique musculaire post-exercice (Larsson, 1982) et la force musculaire (Frontera *et al.*, 1988; Frontera *et al.*, 1990). La capacité de réponse du muscle âgé au stimulus anabolique qu'est l'exercice physique est donc préservée. Ainsi, l'activité physique est une stratégie efficace afin de préserver la masse musculaire squelettique et les performances fonctionnelles chez le sujet âgé (Frontera *et al.*, 1988; Frontera *et al.*, 1990). La compliance et les capacités physiques du sujet âgé freinent toutefois la pratique d'une activité physique importante chez ces personnes. L'idée de cumuler les effets de facteurs stimulant la protéosynthèse musculaire est alors apparue : l'adjonction de compléments protéino-énergétiques au régime accentuerait les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le gain protéique.

Chez l'adulte, la combinaison d'un apport en protéines ou en AAs et de l'exercice physique entraîne un état anabolique net (augmentation de la synthèse protéique sans, ou avec très peu, de changements de la dégradation protéique) (Campbell & Leidy, 2007). Les effets de ces deux facteurs anabolisant seraient additifs et indépendants (Campbell & Leidy, 2007). Ainsi,

l'ingestion de protéines après la pratique d'une activité physique de résistance entraîne une augmentation de la synthèse protéique musculaire (effet maximal et saturable pour 20 g de protéines d'oeuf ingérées) (Moore *et al.*, 2009). De plus, les effets combinés de la pratique d'un exercice physique de résistance et d'un apport en AAE pré- ou post-exercice (15g par jour pendant 2 semaines) permettent le maintien de la masse et de la force musculaires en cas d'immobilisation (Brooks *et al.*, 2008). Le moment de l'ingestion des AAE (i.e. avant, pendant ou après l'exercice physique) aurait peu d'impact sur les résultats obtenus mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser leur utilisation thérapeutique (Koopman & van Loon, 2009).

La coingestion de glucides et de protéines ou d'AAs permet également de promouvoir l'anabolisme protéique musculaire post-exercice (Koopman & van Loon, 2009). Les glucides entraînent une augmentation de l'insulinémie, ce qui limite la dégradation protéique post-exercice (Borsheim *et al.*, 2004). Cependant, les glucides n'apporteraient aucun effet bénéfique additionnel sur la synthèse protéique à celui inhérent aux protéines ou aux AAE (lorsque ceux-ci sont apportés en quantité suffisante) (Koopman *et al.*, 2007).

Les études sur l'effet d'un apport en AAs associé à la pratique d'un exercice physique chez la personne âgée, donnent des résultats contradictoires (Koopman & van Loon, 2009). Selon certains auteurs, l'augmentation des apports protéiques ou en AAE n'apporterait pas d'effet bénéfique supplémentaire sur l'anabolisme protéique, que celui inhérent à la pratique d'un exercice physique (Iglay *et al.*, 2007; Campbell & Leidy, 2007; Koopman *et al.*, 2008; Iglay *et al.*, 2009; Verdijk *et al.*, 2009). De même, Koopman et coll. ne trouvent aucun bénéfice supplémentaire de la Leu sur la synthèse protéique post-exercice (Koopman *et al.*, 2008).

Ces observations restent néanmoins controversées. Une étude a mis en évidence une augmentation de la masse musculaire chez les personnes âgées ayant suivi un programme d'activité physique de résistance et complémentées en protéines et en énergie pendant 12 semaines (vs celles qui n'avaient pas eu d'apports protéino-énergétiques supplémentaires) (Meredith *et al.*, 1992). Cependant, la force musculaire était identique à l'issue de ces 12 semaines, que les sujets aient reçu l'apport protéino-énergétique supplémentaire ou non (Meredith *et al.*, 1992). Une étude similaire, réalisée chez des personnes âgées fragiles résidant en maison de retraite, a toutefois montré une augmentation conséquente de la force musculaire chez les sujets qui avaient suivi un entraînement physique et auxquels un complément nutritionnel avait été administré pendant 10 semaines (par rapport à ceux qui avaient uniquement bénéficié de l'exercice physique) (Singh *et al.*, 1999). Campbell et coll. (1995) ont aussi montré que la réponse hypertrophique du muscle à l'exercice physique augmentait parallèlement à l'augmentation des apports protéiques chez la personne âgée en bonne santé. Plus récemment, une étude a montré que la Leu, administrée après un exercice physique de résistance, augmentait la stimulation de mTOR, et en conséquence la synthèse protéique musculaire (Drummond & Rasmussen, 2008).

OBJECTIF DU TRAVAIL

Aucune stratégie nutritionnelle n'a, pour le moment, permis de compenser la perte des capacités fonctionnelles musculaires survenant au cours du vieillissement. Notre hypothèse de travail est que la Cit, qui est capable de stimuler la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé, pourrait également avoir un impact positif sur les capacités fonctionnelles musculaires.

Notre travail expérimental a pour but d'évaluer les effets de cet AA sur les performances musculaires de rats âgés dénutris et de comprendre par quels mécanismes il agit. Il se compose de deux grandes parties, à savoir une approche fonctionnelle et une approche mécanistique.

Dans une première partie, nous avons étudié l'impact d'une complémentation en Cit sur la fonctionnalité musculaire de rats âgés dénutris. L'activité motrice et la force musculaire ont été mesurées grâce à des tests comportementaux et des mesures électrophysiologiques.

Dans une deuxième partie, nous avons choisi une approche globalisée des mécanismes par lesquels la Cit pourrait agir sur la fonction musculaire. Pour cela, nous avons utilisé la technique de protéomique différentielle afin d'identifier les protéines dont l'expression est modifiée suite à l'ingestion de Cit.

Dans une dernière partie, l'étude clinique CIPROAGE sera décrite. Notre hypothèse de travail est qu'il est possible que la Cit, de par ses propriétés, puisse favoriser l'anabolisme protéique et permette une accréation protéique durable chez la personne âgée dénutrie. L'objectif de CIPROAGE est de mettre en évidence l'effet de la Cit sur l'homéostasie azotée en particulier de vérifier son effet stimulant sur la synthèse protéique chez le sujet âgé dénutri hospitalisé.

PUBLICATIONS ORIGINALES

1. PARTIE EXPERIMENTALE

1.1. Présentation de la publication n°1

Effets de la citrulline et de la leucine sur la fonction musculaire de rats âgés dénutris

Leucine and Citrulline modulate Muscle Function in Malnourished Aged Rats

Cécile Faure, Agathe Raynaud-Simon, Arnaud Ferry, Valérie Daugé, Luc Cynober,
Christian Aussel, Christophe Moinard

Soumis pour publication

Communication orale en congrès

Faure C., Raynaud-Simon A., Le Plenier S., Ferry A., Aussel C., Cynober L., Moinard C.;
Citrulline and leucine stimulate maximal muscle strength in old malnourished rats; Clin Nutr, 3:
20-21, 2008.

1.1.1. Résumé

La dénutrition protéino-énergétique est responsable, chez les personnes âgées, d'une perte préférentielle de masse protéique et du déclin des fonctions musculaires. La Leu et la Cit sont capables de stimuler la synthèse protéique, mais jusqu'à présent aucune étude n'a évalué leurs effets sur la fonction musculaire. Des rats mâles, âgés de vingt-trois mois, ont été utilisés au cours de cette expérimentation. Certains d'entre eux ont été soumis à une restriction alimentaire (50% de leurs ingesta spontanés) pendant 12 semaines et ont ensuite été randomisés en 4 groupes : un groupe de rats a été immédiatement euthanasié (groupe restreint), les autres étant renourris à 90% de leurs ingesta spontanés pendant une semaine soit avec un régime enrichi en Leu ou en Cit, soit avec un régime standard isoazoté. Parallèlement, d'autres rats étaient nourris *ad libitum*. La masse musculaire et l'activité motrice étaient significativement augmentées chez les rats ayant été réalimentés avec de la Leu ou de la Cit (respectivement +51% et +37% pour la masse musculaire, $p < 0,05$). La Leu a permis d'améliorer la force musculaire maximale (+101%, $p < 0,05$). Les améliorations de la masse musculaire et de l'activité motrice induites par la Leu ou la Cit étaient corrélées à celle de la force musculaire maximale ($r = 0,769$, $p < 0,0001$ et $r = 0,389$, $p < 0,05$, respectivement). Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que l'augmentation de la masse musculaire induite par la Leu ou la Cit était associée à l'amélioration des fonctions musculaires, chez des rats âgés dénutris.

1.1.2. Matériel et méthodes

1.1.2.1. Animaux

Des rats Sprague Dawley males, âgés de 23 mois, sont acclimatés dans des cages individuelles pendant 3 semaines. Pendant cette période, les rats sont nourris *ad libitum* avec un régime standard et leurs ingestas spontanés sont mesurés.

1.1.2.2. Descriptif de l'étude

A l'issue de la période d'acclimatation, les rats sont randomisés dans les 5 groupes décrits ci-dessous :

- groupe *ad libitum* (AL) : rats nourris *ad libitum* pendant 13 semaines puis euthanasiés.
- groupe restreint (R) : ces rats ont été soumis à une restriction alimentaire de 12 semaines (50% de leurs ingestas spontanés) puis euthanasiés à la fin de cette période de dénutrition.
- groupe citrulline (CIT) : après 12 semaines de restriction alimentaire, ces rats sont réalimentés pendant 1 semaine avec un régime standard enrichi avec 5g de Cit/kg/jour puis euthanasiés.
- groupe leucine (LEU) : après 12 semaines de restriction alimentaire, ces rats sont réalimentés pendant 1 semaine avec un régime standard enrichi en leucine (en quantité iso-azotée par rapport au régime CIT, soit 11,2 g de Leu/kg/jour), puis euthanasiés.
- groupe acides aminés non essentiels (AANE) : après 12 semaines de restriction alimentaire, ces rats sont réalimentés pendant 1 semaine avec un régime standard (isoazoté par rapport aux régimes CIT et LEU), puis euthanasiés.

Le dernier jour de l'étude, les rats, à l'état post-absorptif, sont soumis à plusieurs tests visant à évaluer la fonction musculaire.

1.1.2.3. Activité motrice et comportement d'alternance spontanée

Le dernier jour de l'expérimentation, les rats ont été soumis à un test d'alternance spontanée et d'activité motrice, dans un labyrinthe en Y (3 bras de taille identique). Le nombre total de bras visités par le rat était comptabilisé pendant une période de 10 min. Une alternance spontanée était considérée comme la succession de visite de 2 bras, le dernier n'ayant pas été visité immédiatement au préalable. Ce paramètre appréciait l'activité motrice de l'animal. Le rapport du nombre d'alternances et du nombre total de bras visités indiquait le comportement d'alternance spontanée de l'animal, paramètre prenant en compte l'attention et/ou les fonctions relatives (Moinard *et al.*, 2004).

1.1.2.4. Propriétés contractiles musculaires

Les rats ont ensuite été anesthésiés à l'isoflurane et la force maximale isométrique du *tibialis anterior* a été déterminée grâce à la mesure de la contraction musculaire en réponse à une stimulation du nerf sciatique. Les tendons distaux du *tibialis* étaient attachés à un transducteur isométrique, ce dernier étant relié à un ordinateur qui permettait l'analyse des données. La force maximale musculaire était ainsi déterminée.

Les rats ont ensuite été euthanasiés.

1.1.2.5. Masse musculaire

Les *tibialis* ont été rapidement prélevés, pesés, congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à l'analyse des échantillons.

1.1.2.6. Contenu protéique musculaire

Les *tibialis* congelés ont été broyés et repris dans une solution d'acide trichloroacétique (10% de TCA). Après délipidation à l'éthanol-éther (1 :1, vol/vol), le précipitat était dissous dans de la NaOH 1N pendant 12h à 40°C. Le contenu en protéines totales était ensuite déterminé selon la méthode décrite par Fleury et Eberhard (1951).

1.1.2.7. Analyses statistiques

La comparaison entre les groupes de données a été réalisée grâce à une analyse de la variance (ANOVA), suivi d'un test PLSD de Fischer, les corrélations grâce à un test Z de corrélation (Statview). Les différences étaient considérées comme significatives pour des valeurs de $p < 0,05$.

1.1.3. Résultats principaux

Masse musculaire : La masse des *tibialis* des rats renourris avec de la Leu (n=8) était significativement augmentée par rapport aux rats AL (n=8), AANE (n=7) et R (n=6) ($p < 0,05$). La masse des *tibialis* des rats renourris avec de la Cit était significativement augmentée par rapport aux rats AL ($p < 0,05$).

Contenu protéique musculaire : Les contenus protéiques musculaires des rats renourris avec de la Leu ou de la Cit avaient quasi doublé (i.e. + 66% et +71% respectivement) par rapport aux rats R et étaient augmentés d'environ 15% par rapport aux rats AL. Ces différences n'atteignaient pas la significativité, cependant la masse et le contenu protéique musculaires étaient fortement corrélés ($r = 0,854$; $p < 0,0001$).

Test du labyrinthe en Y : Les rats renourris avec de la Cit ou de la Leu visitaient significativement plus de bras du labyrinthe que les rats du groupe AL ($p < 0,05$) et ce dernier paramètre était corrélé avec la masse du *tibialis* ($r = 0,417$, $p < 0,01$). L'alternance spontanée n'était pas affectée par les régimes.

Force musculaire maximale : La force musculaire maximale des rats renourris avec de la Leu était significativement augmentée ($p < 0,05$) par rapport aux rats AL et AANE. Pour ceux renourris avec de la Cit, cet effet n'atteignait pas la significativité ($p = 0,068$).

La force musculaire maximale était fortement corrélée à la masse du *tibialis* ($r=0,769$, $p<0,0001$).

Une relation apparaissait aussi entre la force et le nombre de bras visités, paramètre reflétant l'activité motrice et le comportement d'exploration ($r=0,389$, $p<0,05$).

1.1.4. Conclusion

Ce travail est le premier à établir que l'utilisation d'AAs (Leu ou Cit) améliore la masse et la fonction musculaires de rats âgés dénutris, à l'état post-absorptif. Nous avons aussi mis en évidence une relation significative entre la masse musculaire et des approches fonctionnelles du muscle. Ainsi l'administration de Leu ou de Cit pourrait être une stratégie efficace et prometteuse afin de prévenir et/ou traiter la dynapénie retrouvée chez la personne âgée. Elle pourrait en conséquence, limiter les déficits fonctionnels musculaires et la morbi-mortalité liée à la dénutrition protéino-énergétique des personnes âgées.

Leucine and Citrulline modulate Muscle Function in Malnourished Aged Rats

*Cécile Faure¹, Agathe Raynaud-Simon^{1,2}, Arnaud Ferry³, Valérie Dauge⁴, Luc Cynober^{1,5}, Christian Aussel^{1,6}, Christophe Moinard¹

¹*Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique (EA 4466), Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 75 270 Paris Cedex 06, France;*

²*Département de Gériatrie, Hôpital Universitaire Bichat, AP-HP, 75 877 Paris, France;*

³*INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, 75 013 Paris, France;*

⁴*INSERM U952, CNRS UMR 7224, UPMC, Université Pierre et Marie Curie, 75 252 Paris Cedex 05, France;*

⁵*Service interhospitalier de Biochimie, Hôpitaux Cochin et Hôtel Dieu, AP-HP, 75 181 Paris Cedex 04, France ;*

⁶ *Service interhospitalier de Biologie, Hôpital Emile Roux, AP-HP, 94 456 Limeil-Brévannes, France.*

***Corresponding author:** C. Moinard, Tel: (+33) 1.53.73.99.80 Fax: (+33) 1.53.73.99 52

E-mail: christophe.moinard@parisdescartes.fr

Short title : Leucine, citrulline and muscle function

ABSTRACT

Protein energy malnutrition in the elderly causes preferential loss of muscle mass which is associated with poor functional states. Leucine and citrulline are able to stimulate muscle protein synthesis in malnourished aged rats but no study has been undertaken to evaluate their effect on muscle function. Sprague Dawley male rats aged 23 months were used in the experiment. Part of them were subjected to a dietary restriction for 12 weeks and then assigned to four groups: a group was euthanized (restricted group), and the others were refed for 1 week with either a leucine-, a citrulline-supplemented diet, or a standard diet. The other rats were fed *ad libitum*. Muscle mass and motor activity significantly increased during the refeeding with either leucine or citrulline (respectively +51% and +37% for muscle mass, $p<0.05$). The improvement of muscle mass and of motor activity induced by leucine and citrulline was highly associated with that of maximal tetanic isometric force ($r=0.769$, $p<0.0001$ and $r=0.389$, $p<0.05$, respectively) but only leucine improved maximal tetanic isometric force (+101%, $p<0.05$).

Key words: amino acids, muscle mass, maximal tetanic isometric force, motor activity, ageing

ABBREVIATIONS

AA : amino acids

Cit: citrulline

Leu: leucine

AL: *ad libitum*

R: restricted

NEAA: non-essential amino acids

isoN: isonitrogenous

TCA: trichloroacetic acid

INTRODUCTION

Malnutrition in the elderly is a major health and societal concern as it contributes to increased morbidity and mortality (Bouillanne *et al.* 2005; Kagansky *et al.* 2005). Indeed, 4 to 10% of elderly people who live in community and up to 70% of those who are hospitalized are concerned by protein energy malnutrition (HAS 2007; Sullivan 1995). Malnutrition contributes to enhanced risk of falls, fractures, infections and blunted response to aggression, which leads to disability and poor quality of life in the elderly (Capodaglio *et al.* 2007; Liu and Latham 2009). Considering these alarming data and the rising number of elderly people in western countries, there is an urgent need to find a way to limit or avoid malnutrition among them.

The ability to recover from a malnourished state is decreased in elderly patients and in rodents (Hebuterne *et al.* 1995; Hebuterne *et al.* 1997; Seiler 2001; Walrand *et al.* 2000). The resistance to renutrition is multifactorial but seems to be mainly due to the significant increase in amino acids (AA) catabolism within the splanchnic area which occurs in the elderly (Boirie *et al.* 1997; Volpi *et al.* 2001) and in aged rats (Jourdan *et al.* 2007). This results in inadequate systemic plasma levels of AA (Mosoni *et al.* 1995), low aminoacidemia and blunted protein synthesis rates at the postprandial state (Dardevet *et al.* 2002). In addition, there is a resistance to anabolic stimuli at muscle level: anabolic response of muscle to orally ingested AA is impaired in the elderly compared to adults, in whom similar AA load stimulates muscle protein synthesis (Guillet *et al.* 2004).

However, recent research suggests that nutritional manipulations may be an efficient way to preserve muscle mass and to improve muscle function. Indeed, leucine (Leu) does not escape the splanchnic area extraction in aged subjects but it has been shown to be the most efficient amino acid among other essential amino acids to stimulate muscle protein synthesis in the elderly

(Dardevet *et al.* 2002; Katsanos *et al.* 2006; Rieu *et al.* 2003; Rieu *et al.* 2007) in post-prandial state. Conversely, citrulline (Cit) a non-protein AA that has been for long under-estimated (Curis *et al.* 2005), escapes the splanchnic extraction. Two recent studies have shown that Cit is an activator of muscle protein synthesis in malnourished aged rats (Osowska *et al.* 2006) and in healthy subjects fed a hypoprotein diet (Jourdan *et al.* 2008), respectively (for a complete review, see Moinard and Cynober 2007).

An improvement of muscle protein synthesis *per se* has limited interest (Clark and Manini 2008) if it does not lead to an improvement of muscle function, which enables aged people to preserve their mobility and independence. To the best of our knowledge, so far, no nutritional intervention alone has been shown to improve muscle function and the link between increased muscle protein synthesis and improvement of muscle function is not established. As it is already established that Leu or Cit both restore muscle protein synthesis in the late ages of life, we intended to determine whether this anabolic action is associated to an improvement of muscle function. If so, these AA could represent an interesting nutritional strategy to prevent and treat protein-energy malnutrition that occurs in elderly subjects.

The aim of this study was to evaluate the effect of diets supplemented with Cit or Leu on parameters reflecting muscle function and associated behaviours in a validated model of protein-energy malnutrition in aged rats (Chambon-Savanovitch *et al.* 1999; Felgines *et al.* 1999; Walrand *et al.* 2000), at the post-absorptive state.

MATERIAL AND METHODS

Animal care complied with the French regulations for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (D 2001-486) and with European Community regulations (Official Journal of the European Community, L538 12:18:1986). The experimental protocol was approved by the local ethics committee for animal research (registered number P2.CM.035.07).

All the chemicals and AA used in this experiment were purchased from Sigma (Saint Quentin, Fallavier, France) except for Cit which was a gift from Kyowa Hakko (Tokyo, Japan).

Animals

Thirty-seven male Sprague-Dawley rats, 23 months of age (Charles-River, L'Arbresle, France) were housed individually at 20-23°C with an alternate 12-hour-light-dark-cycle. They had free access to water. During the 3-week acclimatization period all rats were fed *ad libitum* (AL) with a standard diet containing 17% (w/w) proteins, 3% (w/w) lipids, 59% (w/w) carbohydrates, 21% (w/w) water, fibres, vitamins and minerals (Safe, Villemoisson-sur-Orge, France). Daily spontaneous intakes were recorded.

Study design

After the acclimatization period, the rats were randomised into the 5 following groups (figure 1):

- AL group : the rats were fed AL during 13 weeks and then killed.

- Restricted group (R) : the rats underwent a dietary restriction for 12 weeks (50% of their spontaneous intakes recorded during the acclimatization period) (Osowska *et al.* 2006; Walrand *et al.* 2000) and were killed at the end of this period of restriction.

- CIT group : after 12 weeks of dietary restriction, the rats were refed for one week with a standard diet supplemented with 5 g Cit/kg/day, which represents 1.2 g N/kg/day, and then killed. This dose of Cit is the extrapolation of doses used in humans taking into consideration that the metabolic rate and nitrogen requirements of rats are 10 times those of humans (Osowska *et al.* 2006). Food was limited to 90% of spontaneous intake to ensure the rats ate their entire ration and hence received the same amounts of food.

- LEU group : after 12 weeks of dietary restriction, the rats were refed for one week with a standard diet supplemented with Leu (11.2 g/kg/day) in isonitrogenous quantity to the Cit diet, i.e. 1.2 g N/kg/day.

- Non-essential amino acids (NEAA) group : after 12 weeks of dietary restriction, the rats were refed for one week with a standard diet supplemented with NEAA (alanine, glycine, proline, histidine, aspartate and serine, in equimolar ratio) isonitrogenous to the Cit and Leu diets, i.e. 1.2 g N/kg/day.

On the last day of the experiment, the rats at the post-absorptive state were submitted to a behavioural test aimed to determine motor activity and spontaneous alternation. Maximal tetanic isometric force was measured by electrophysiological methods (see below for details); blood was sampled and the *tibialis* anterior muscle was rapidly removed and weighed just after the rat was killed. *Tibialis* muscle was chosen because of its richness in type 2 fibres, mainly affected by age.

Motor activity and spontaneous alternation behaviour

The rats were tested for spontaneous alternation and motor activity behaviour in a Y-maze. The apparatus consisted of a symmetrical Y-maze with 40-cm-long, 15-cm-wide and 35-cm-high arms as described previously (Moinard *et al.* 2004). The apparatus was illuminated from above (35 lux) and the floor was covered with a small amount of sawdust. Behaviour was observed by a trained experimenter. The rats were put in one arm of the maze and the sequence and number of arm entries were recorded over a period of 10 minutes. An arm visit was recorded when a rat moved all four paws into the arm. Scoring of alternations consisted in the evaluation of response sequences, in which entering the arm least recently visited was considered an alternation response. The proportion of alternations was computed by dividing the number of alternations by the total number of arm visits. To obtain an accurate evaluation of the qualitative aspects of the behaviour, a minimum of nine visits was retained to calculate the percentage of spontaneous alternation behaviour. This test allowed us to determine two behavioural parameters as the proportion of alternations is a good indicator of attention and/or related functions, and the total number of visited arms is a good indicator of motor activity.

Maximal tetanic isometric force

At the end of the experiment, the rats were anaesthetized with isoflurane and the *tibialis* anterior muscle function was evaluated by measuring *in situ* muscle contraction in response to nerve stimulation. Their knees and feet were fixed using clamps and pins. The distal tendons of the *tibialis* muscles were attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience, Les Ulis, France) using a silk ligature. All data provided by the isometric transducer were recorded and analysed on a microcomputer (PowerLab system: ADInstruments, Paris, France). The sciatic nerves were stimulated by bipolar silver electrodes using supramaximal square wave pulse of 0.2

ms duration. All isometric measurements were then made and at an initial muscle length of L_0 (length at which maximal tension was obtained during the twitch). Several tetani responses (75-145 Hz) were successively recorded. Maximal tetanic isometric force was determined.

In this study, the mentioned muscle function will be limited to maximal tetanic isometric force and motor activity.

The rats were then killed by decapitation.

Muscle mass

After the rats were killed and *tibialis* muscles were rapidly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Muscle protein content

The frozen *tibialis muscles* were pulverized and homogenized in ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) (1 ml TCA/100 mg tissue) using an Ultra-Turrax T25 tissue disrupter (Ika Labortechnik, Staufen, Germany). After delipidation with ethanol-ether (1:1, vol/vol), the precipitate was dissolved in 1 N NaOH (4 ml/100 mg tissue) for 12 h at 40°C . The total protein content was then determined according to the method described by Fleury *et al.* (1951) on a Genesys spectrophotometer (ThermoSpectronic, New York, NY).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Comparisons between sets of data were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the PLSD Fisher test. Correlations were made by using the Z-correlation test. The Statview software was used. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Muscle mass

Tibialis anterior muscles of the Leu-refed (n=8) rats were significantly heavier than those of the AL-fed rats (n=8), R rats (n=6) and NEAA-refed rats (n=7) ($p<0.05$). The rats refed with Cit (n=8) had a significantly increased muscle mass compared to the AL fed rats ($p<0.05$) (figure 2).

Muscle protein content

Muscle protein content of the Cit- and Leu-refed rats was strongly higher (i.e. + 66% and 71%, respectively) compared to the R rats and around 15% greater than that of the AL-fed rats (figure 3). However, the differences did not reach significance. Of note, the muscle protein content and muscle mass were correlated ($r=0.854$, $p<0.0001$) (figure 4).

Maximal tetanic isometric force

Maximal tetanic isometric force was significantly increased ($p<0.05$) in the Leu-refed rats compared to the AL-fed rats and the NEAA-refed rats (figure 5). For Cit, this effect did not reach significance ($p=0.068$).

Y maze test

The rats refed with either Leu or Cit visited significantly more arms of the Y-maze than the AL-fed rats ($p<0.05$) (figure 6), and this latter parameter was correlated with *tibialis* mass ($r=0.417$, $p<0.01$) (figure 7). The spontaneous alternation, ranging from 60 to 70%, was not affected by the different diets (data not shown).

Other correlations between parameters

Maximal tetanic isometric force was strongly correlated with *tibialis* mass ($r=0.769$, $p<0.0001$) (figure 8). A relationship was also shown between maximal tetanic isometric force and the number of visited arms, which reflects motor activity and exploration ($r= 0.389$, $p<0.05$, not shown).

DISCUSSION

Decreased muscle mass (i.e. sarcopenia (Rolland and Vellas 2009)) and function (i.e. dynapenia (Clark and Manini 2008)) may lead to frailty and disability in the elderly. To our knowledge, there is in this population no evidence of benefits of nutritional supplements *per se* to improve maximal tetanic isometric force and motor activity represented here by the mention muscle function.

A recent Cochrane review showed protein-energy supplementation induces weight gain, reduces mortality and complications in malnourished elderly patients, but there is no evidence for functional benefit (Milne *et al.* 2009). The effect of dietary counselling and multivitamin supplementation during 4 months was studied in discharged geriatric patients at risk of malnutrition. This nutritional intervention allowed them to maintain weight and improve activities of daily living, but muscle strength (grip strength) recovering was not improved (Persson *et al.* 2007). In a 12-week-resistance training program in aged men, muscle strength was not further increased when supplemented with a mix of amino acids containing Leu (Godard *et al.* 2002). Resistance training does improve muscle strength in healthy or frail elderly (Capodaglio *et al.* 2007; Liu and Latham 2009) but is sometimes difficult to achieve due to poor compliance, and maybe even more so in malnourished elderly patients. Nutritional manipulations may represent an easy complementary strategy in this population.

Since Leu and Cit benefit muscle protein synthesis in old rats (Dardevet *et al.* 2002; Rieu *et al.* 2003; Osowska *et al.* 2006), we investigated whether these two AA could also lead to an improvement of the parameters reflecting muscle function in malnourished old rats. Of note, the effect of short-term Leu and Cit supplementation on muscle function during renutrition has never been explored before. In our study, we showed for the first time that nutritional manipulations

per se are able to improve maximal tetanic isometric force and motor activity in malnourished aged rats.

Leu improved maximal tetanic isometric force (i.e. + 101% and 76% *vs* AL and NEAA, respectively) in our model of malnourished old rats. In the elderly, the improvement in maximal tetanic isometric force is important because muscle strength predicts mortality, whatever its causes (Gale *et al.* 2007; Newman *et al.* 2006; Ruiz *et al.* 2008). A recent work (Verhoeven *et al.* 2009) including 30 healthy elderly men showed no improvement in muscle mass and maximal strength after a 3-month-Leu-supplementation. Therefore, the effect of Leu may differ whether short or long term supplementation and whether malnourished or healthy individuals are studied. So, further studies about the effects of Leu supplementation in malnourished elderly patients are required in order to clarify.

Leu and Cit had a similar action on motor activity. For both Leu- and Cit-refed old rats, the total number of visited arms increased to the level observed in younger adult rats (Moinard *et al.* 2004), leading to the conclusion that these two amino acids restore motor activity to that observed in the young. The rats' spontaneous alternation behaviour tested in the Y-maze test, which appraises attention and related functions, was not different between groups. Therefore, the increase in motor activity in Leu- and Cit - supplemented rats was not due to changes in cognitive functions (i.e., attention, memory, fear or anxiety) (Moinard *et al.* 2004). Values obtained here for spontaneous alternation are very close to the references we got for younger rats (Moinard *et al.* 2004), which means that exploratory behaviour is preserved in aged rats. Increase in motor activity obtained by Leu- or Cit-treatment may thus ensue from improvement of muscle function.

Although differences do not reach significance, muscle protein content of the Cit- and Leu-refed rats was 66% and 71% greater than the R rats respectively, and around 15% greater than that of the AL-fed rats, which is in line with previous observations (Moinard and Cynober

2007; Osowska *et al.* 2006). Although *tibialis* mass was not reduced in R-rats compared to AL fed rats, protein content was. This hardly suggests a preferential loss of protein in the R rats muscles. These data underline the importance to prevent protein loss in protein energy malnutrition. Relative quantity of proteins in muscle (expressed in mg of protein/g of muscle) was decreased by 30% in R-rats compared to AL fed rats (data not shown), showing the effectiveness of our model of malnutrition on muscle protein store. Moreover, this decreased muscle protein content observed in R-rats was not followed by a decreased muscle force and underlines the complexity about the relationship between muscle protein content and muscle function (Clark and Manini 2008).

Leu and Cit both increased muscle mass and this latter parameter was strongly correlated with the increased muscle protein content, as previously observed for Cit (Osowska *et al.* 2006). Muscle mass was also positively correlated with maximal tetanic isometric force and motor activity (number of visited arms in the Y maze), suggesting that Leu and Cit have beneficial effects on muscle that enable the restoration of muscle function. In the literature (Clark and Manini 2008; Harris 1997), the association between muscle mass and strength is controversial. Initial investigations concluded that muscle mass is a major determinant of the changes of maximal muscle strength in old individuals, with a linear relationship between the two (Frontera *et al.* 1991; Hughes *et al.* 2001; Newman *et al.* 2003). However, in further studies, no association was found: either an improvement of muscle mass without any improvement of maximal muscle strength was shown or the reverse (Beliaeff *et al.* 2008; Goodpaster *et al.* 2006; Rolland and Vellas 2009). In fact, other parameters, such as neurological and other skeletal muscle factors, may contribute to a decreased muscle function independently of changes in muscle mass (Clark and Manini 2008; Rolland and Vellas 2009). Interestingly, an isolated improvement of maximal muscle strength (without no increase in mass) allows for an improvement of muscle functional

performance, whereas an increase in muscle mass only does not improve it (Rolland and Vellas 2009). In our study, increased muscle mass was associated with both improvement of maximal tetanic isometric force and motor activity.

Cit and Leu are both known to modulate muscle protein synthesis but an alternative mechanism may be proposed: many works (Meneilly *et al.* 1995; Rasmussen *et al.* 2006) have clearly established that the physiological insulin-stimulated increase in endothelial-dependant vasodilatation is blunted in healthy elders. A recent study (Timmerman *et al.* 2010) has shown that increasing blood flow and muscle perfusion during hyperinsulinemia in older adults enhances muscle protein synthesis. It is also known that decline in muscle function is associated with blood flow restriction (Corcondilas *et al.* 1964; Laughlin and Armstrong, 1982; Radegran and Saltin 1998). Based on these overall data, we may suggest both Leu and Cit would be able to improve muscle performance, Leu by stimulating insulin secretion (Anthony *et al.* 2002) and Cit by increasing arginine production (Deutz 2008; Moinard and Cynober 2007).

In conclusion, this work is the first to establish that a specific nutritional manipulation (i.e. Leu supplementation) improves muscle mass and function (i.e. motor activity and maximal tetanic isometric force) in malnourished aged rats, at the post-absorptive state, when administered for a short time-period. We also show a significant relationship between muscle mass and relevant functional end-points, both for Leu- or cit-treatment. Thus, Leu or Cit may be efficient and promising strategies to prevent and treat dynapenia that occurs in the elderly, and therefore might limit functional impairment and protein energy malnutrition-related morbi-mortality in the elderly.

Literature Cited

- Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, Anthony TG, MacLean DA, Kimball SR, Jefferson LS (2002) Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E1092-E1101.
- Beliaeff S, Bouchard DR, Hautier C, Brochu M, Dionne IJ (2008) Association between muscle mass and isometric muscle strength in well-functioning older men and women. *J Aging Phys Act* 16:484-493.
- Boirie Y, Gachon P, Beaufrere B (1997) Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 65:489-495.
- Bouillanne O, Morineau G, Dupont C, Coulombel I, Vincent JP, Nicolis I, Benazeth S, Cynober L, Aussel C (2005) Geriatric Nutritional Risk Index: a new index for evaluating at-risk elderly medical patients. *Am J Clin Nutr* 82:777-783.
- Capodaglio P, Capodaglio EM, Facioli M, Saibene F (2007) Long-term strength training for community-dwelling people over 75: impact on muscle function, functional ability and life style. *Eur J Appl Physiol* 100:535-542.
- Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Farges MC, Pernet P, Cezard J, Raul F, Cynober L, Vasson MP (1999) Severe dietary restriction initiated in aged rats: evidence for poor adaptation in terms of protein metabolism and intestinal functions. *Eur J Clin Invest* 29:504-511.
- Clark BC, Manini TM (2008) Sarcopenia \neq dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63:829-834.
- Corcondilas A, Koroxenidis GT, Shepherd JT (1964) Effect of a brief contraction of forearm muscles on forearm blood flow. *J Appl Physiol* 19:142-146.
- Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S, Cynober L (2005) Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 29:177-205.
- Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Grizard J (2002) Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr* 132:95-100.
- Deutz NE (2008) The 2007 ESPEN Sir David Cuthbertson Lecture: amino acids between and within organs. The glutamate-glutamine-citrulline-arginine pathway. *Clin Nutr* 27:321-327.
- Felgines C, Savanovitch C, Farges MC, Cynober L, Vasson MP (1999) Protein metabolism in rats during long-term dietary restriction: influence of aging. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23:32-37.

Fleury P, Eberhard R (1951) Determination of proteins by photometric, biuret method, according to the technique of Gornall. *Ann Biol Clin (Paris)* 9:453-466.

Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ, Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 71:644-650.

Gale CR, Martyn CN, Cooper C, Sayer AA (2007) Grip strength, body composition, and mortality. *Int J Epidemiol* 36:228-235.

Godard MP, Williamson DL, Trappe SW (2002) Oral amino-acid provision does not affect muscle strength or size gains in older men. *Med Sci Sports Exerc* 34:1126-1131.

Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M, Newman AB (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:1059-1064.

Guillet C, Prod'homme M, Balage M, Gachon P, Giraudet C, Morin L, Grizard J, Boirie Y (2004) Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J* 18:1586-1587.

Harris T (1997) Muscle mass and strength: relation to function in population studies. *J Nutr* 127:1004S-1006S.

HAS (2007) Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée.

Hebuterne X, Broussard JF, Rampal P (1995) Acute renutrition by cyclic enteral nutrition in elderly and younger patients. *JAMA* 273:638-643.

Hebuterne X, Schneider S, Peroux JL, Rampal P (1997) Effects of refeeding by cyclic enteral nutrition on body composition: comparative study of elderly and younger patients. *Clin Nutr* 16:283-289.

Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R, Fiatarone Singh MA (2001) Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B209-B217.

Jourdan M, Cynober L, Moinard C, Blanc MC, Neveux N, De Bandt JP, Aussel C (2007) Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:748-755.

Jourdan M, Nair KS, Ford C, Shimke J, Ali B, Will B, Marc J, Aussel C, Cynober L (2008) Citrulline stimulates muscle protein synthesis at the post-absorptive state in healthy subjects fed a low protein diet. *Clin Nutr* 3:11-12.

Kagansky N, Berner Y, Koren-Morag N, Perelman L, Knobler H, Levy S (2005) Poor nutritional habits are predictors of poor outcome in very old hospitalized patients. *Am J Clin Nutr* 82:784-791.

Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR (2006) A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E381-E387.

Laughlin MH, Armstrong RB (1982) Muscular blood flow distribution patterns as a function of running speed in rats. *Am J Physiol* 243:H296-H306.

Liu CJ, Latham NK (2009) Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD002759.

Meneilly GS, Elliot T, Bryer-Ash M, Floras JS (1995) Insulin-mediated increase in blood flow is impaired in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1899-1903.

Milne AC, Potter J, Vivanti A, Avenell A (2009) Protein and energy supplementation in elderly people at risk from malnutrition. *Cochrane Database Syst Rev* CD003288.

Moinard C, Cynober L (2007) Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis. *J Nutr* 137:1621S-1625S.

Moinard C, Dauge V, Cynober L (2004) Ornithine alpha-ketoglutarate supplementation influences motor activity in healthy rats. *Clin Nutr* 23:485-490.

Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY, Mirand PP (1995) Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol* 268:E328-E335.

Newman AB, Haggerty CL, Goodpaster B, Harris T, Kritchevsky S, Nevitt M, Miles TP, Visser M (2003) Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 51:323-330.

Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick EM, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Tylavsky FA, Rubin SM, Harris TB (2006) Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:72-77.

Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, Moinard C (2006) Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E582-E586.

Persson M, Hytter-Landahl A, Brismar K, Cederholm T (2007) Nutritional supplementation and dietary advice in geriatric patients at risk of malnutrition. *Clin Nutr* 26:216-224.

Radegran G, Saltin B (1998) Muscle blood flow at onset of dynamic exercise in humans. *Am J Physiol* 274:H314-H322.

Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL, Volpi E (2006) Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J* 20:768-769.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J, Dardevet D (2007) Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* 23:323-331.

Rieu I, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Balage M, Papet I, Grizard J, Dardevet D (2003) Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr* 133:1198-1205.

Rolland Y, Vellas B (2009) Sarcopenia. *Rev Med Interne* 30:150-160.

Ruiz JR, Sui X, Lobelo F, Morrow JR, Jr., Jackson AW, Sjostrom M, Blair SN (2008) Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ* 337:a439.

Seiler WO (2001) Clinical pictures of malnutrition in ill elderly subjects. *Nutrition* 17:496-498.

Sullivan DH WRaBM (1995) Protein-energy undernutrition and the risk of mortality within one year of hospital discharge: a follow-up study. *J Am Geriatr Soc* 43:507-512.

Timmerman KL, Lee JL, Fujita S, Dhanani S, Dreyer HC, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Volpi E (2010) Pharmacological vasodilation improves insulin-stimulated muscle protein anabolism but not glucose utilization in older adults. *Diabetes*. In press, doi:10.2337/db10-0415.

Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, Koopman R, Wodzig WK, Dendale P, van Loon LJ (2009) Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr* 89:1468-1475.

Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR (2001) Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA* 286:1206-1212.

Walrand S, Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Chassagne J, Raul F, Normand B, Farges MC, Beaufrere B, Vasson MP, Cynober L (2000) Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats. *Am J Clin Nutr* 72:816-824.

Fig. 1: Study design.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; NEAA, CIT and LEU rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a NEAA-, a Cit- or a Leu-enriched diet. Diets were isoN and isoenergetic.

Fig. 2: Effects of the different diets on *tibialis* mass.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; NEAA, LEU and CIT, rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a NEAA-, a Leu- or a Cit-enriched diet. Diets were isoN and isoenergetic. ANOVA + PLSD Fischer test : * $p < 0.05$ vs AL, α $p < 0.05$ vs NEAA, # $p < 0.05$ vs R.

Fig. 3: Effects of the different diets on *tibialis* protein content.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; NEAA, LEU and CIT, rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a NEAA-, a Leu- or a Cit-enriched diet. Diets were isoN and isoenergetic. ANOVA.

Fig. 4: Correlation between *tibialis* mass and *tibialis* protein content.

Z-correlation test: $r = 0.854$, $p < 0.0001$.

Fig. 5: Effects of the different diets on the maximal tetanic isometric force.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; NEAA, LEU and CIT, rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a NEAA-, a Leu- or a Cit-enriched diet. Diets were isoN and isoenergetic. ANOVA + PLSD Fischer test : * $p < 0.05$ vs AL, α $p < 0.05$ vs NEAA.

Fig 6: Effects of the different diets on the number of visited arms in the Y maze.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; NEAA, LEU and CIT, rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a NEAA-, a Leu- or a Cit-enriched diet. Diets were isoN and isoenergetic. ANOVA + PLSD Fischer test : * $p < 0.05$ vs AL.

Fig. 7: Correlation between *tibialis* mass and number of visited arms.

Z-correlation test: $r = 0.417$, $p < 0.01$.

Fig. 8: Correlation between *tibialis* mass and maximal tetanic isometric force.

Z-correlation test: $r = 0.769$, $p < 0.0001$.

Figure 1 :

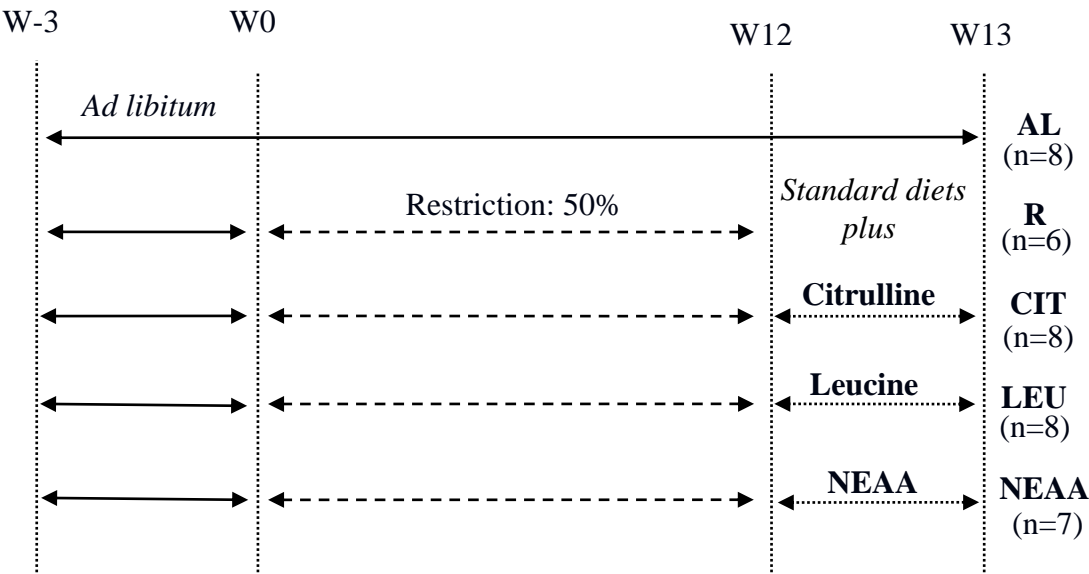


Figure 2 :

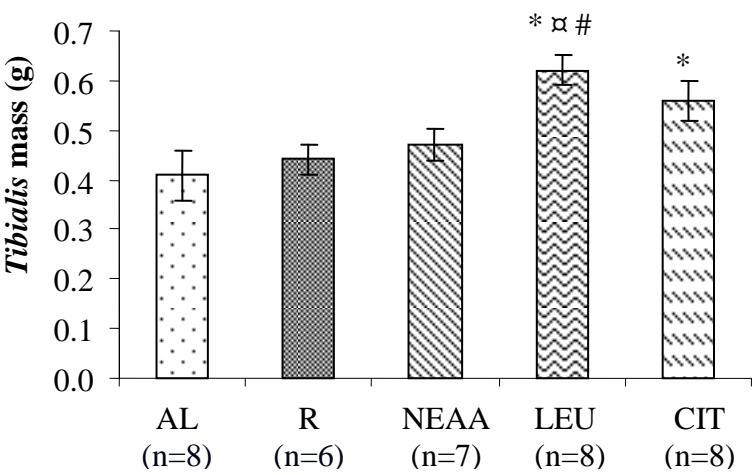


Figure 3 :

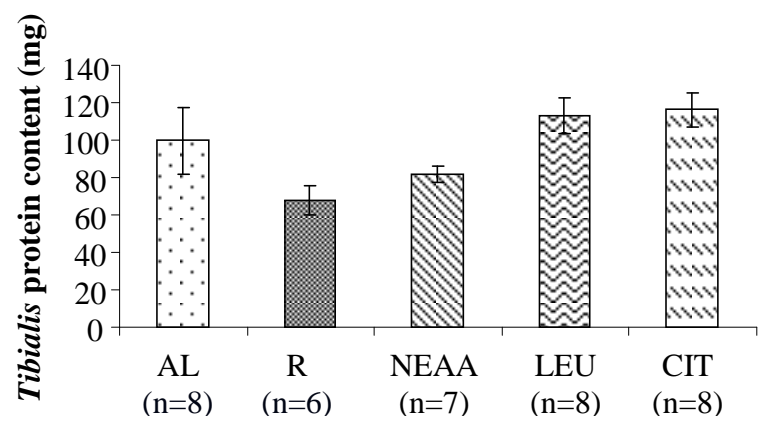


Figure 4 :

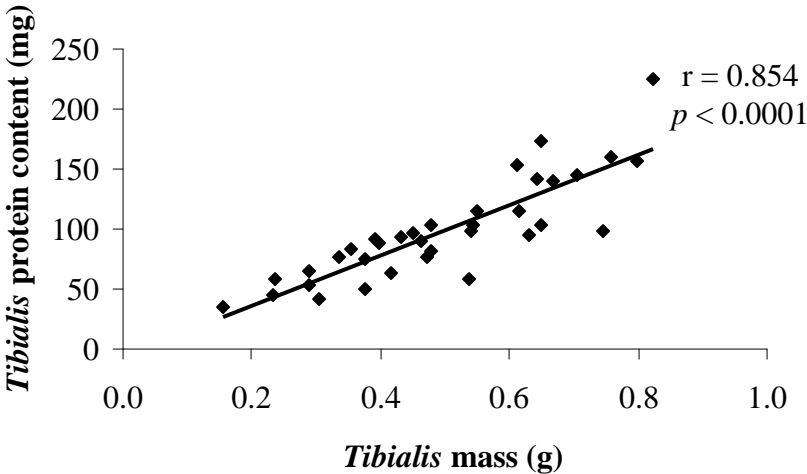


Figure 5 :

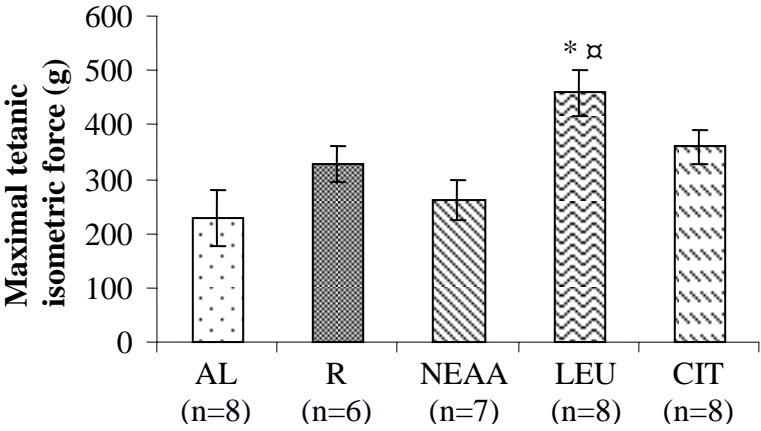


Figure 6 :

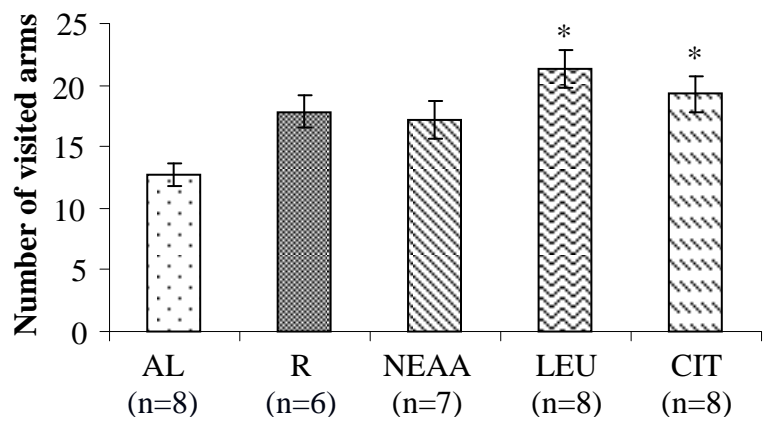


Figure 7 :

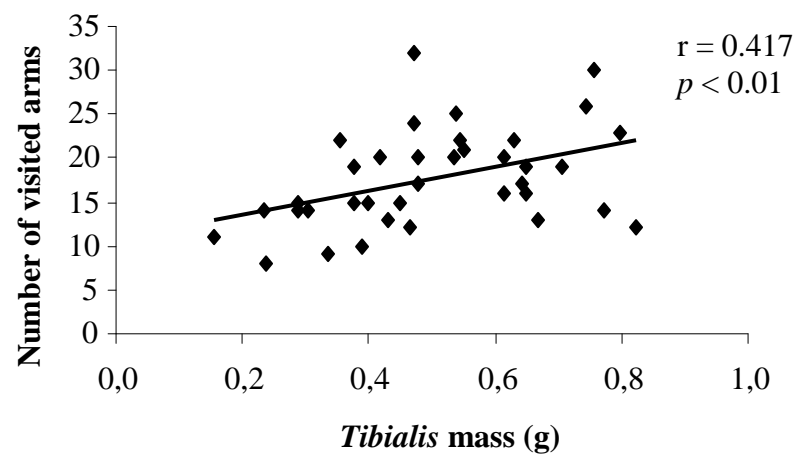
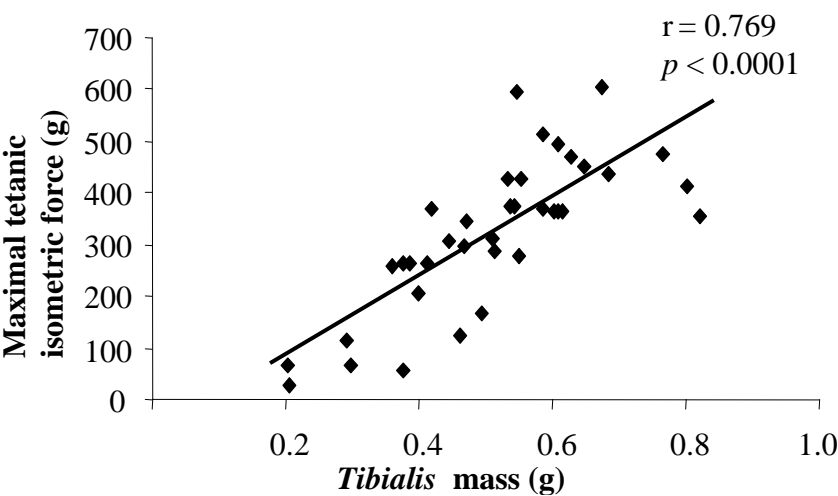


Figure 8 :



1.2. Présentation de la publication n°2

La Citrulline module le métabolisme énergétique et l'expression des protéines myofibrillaires chez les rats âgés dénutris

***Effects of Citrulline on skeletal muscle proteome
in malnourished aged rats***

Cécile Faure, Béatrice Morio-Liondore, Philippe Chafey, Luc Cynober, Christian Aussel,
Christophe Moinard

Prix de recherche en Nutrition de l'Institut APPERT

Intérêt d'une administration de citrulline sur la synthèse protéique musculaire: étude préliminaire chez le rat âgé dénutri, analyse protéomique.

Communication orale en congrès

Faure C., Chafey P., Cynober L., Aussel C., Moinard C.; Action de la citrulline au niveau musculaire : approche protéomique ; Nutrition clinique et métabolique 2009 ; 23(1) : S24.

1.2.1. Résumé

La Cit module le métabolisme protéique mais son mécanisme d'action reste à élucider. Nous l'appréhendons ici *via* une approche protéomique. Des rats mâles Sprague-Dawley, âgés de 23 mois ont été répartis en 4 groupes (AL, CIT, R et AANE) et ont subi les mêmes interventions nutritionnelles que celles décrites dans la publication précédente. L'expression des protéines à partir d'extraits totaux des *tibialis* a été évaluée à l'aide de la technique 2D-DIGE.

La Cit entraîne une surexpression significative des constituants principaux du cytosquelette musculaire (α -actine, α -actinine 1, chaînes légères de la myosine 1 et 3, régulatrice 2 et chaîne lourde de la myosine 4) et de certaines enzymes impliquées dans la glycogénolyse (i.e. glycogène phosphorylase) et la glycolyse (i.e., phosphoglucomutase 1, 6-phosphofructokinase, triosephosphate isomérase, β -énolase et les isozymes M1/M2 de la pyruvate kinase). Par ailleurs, l'expression d'enzymes du cycle de Krebs (i.e., isocitrate déshydrogénase et succinate déshydrogénase) et de la chaîne respiratoire mitochondriale (i.e., complexe NADH déshydrogénase, NADH ubiquinone oxydo-réductase) était significativement diminuée. Nous avons aussi mis en évidence une diminution de l'expression de la sous-unité 1 du complexe activateur du protéasome et de la protéine de choc thermique 70 kDa (hsp 70). Ces résultats ont été confirmés par *western blot*. Toutefois, la plupart des activités des enzymes clés du métabolisme mitochondrial et les niveaux d'expression des ARNm des protéines d'intérêt, n'était pas affectée par les régimes. La Cit entraîne une augmentation de l'expression des principales protéines myofibrillaires, ainsi qu'une modification coordonnée de l'expression de certaines enzymes, suggérant une réorientation du métabolisme énergétique.

1.2.2. Matériel et méthodes

1.2.2.1. Animaux

Des rats Sprague Dawley males, âgés de 23 mois, sont acclimatés dans des cages individuelles pendant 3 semaines. Pendant cette période, les rats sont nourris *ad libitum* avec un régime standard et leurs ingesta spontanés sont mesurés.

1.2.2.2. Descriptif de l'étude

Voir publication précédente pour le protocole expérimental.

Les *tibialis* ont été rapidement prélevés, pesés, congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses.

1.2.2.3. Analyse de protéomique différentielle

Cette méthode d'analyse protéomique différentielle utilise la technologie de l'électrophorèse bi-dimensionnelle (2-D) associée à un marquage des échantillons avec des fluorophores Saturation Dye Cy2, Cy3 et Cy5 (Reddy & Dalmaso, 2003). A l'aide d'un scanner spécifique (Typhoon), il est possible de comparer sur le même gel un échantillon de cas et un échantillon de témoin marqués chacun par un fluorophore différent. L'identification par des outils informatiques (Decyder) permet ensuite de cerner les spots différentiellement exprimés. Les spots sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

1.2.2.4. Western blot

Les différences d'expression protéique identifiées par l'analyse de protéomique différentielle avec le régime Cit ont été vérifiées par western blot. Ainsi, les *tibialis* des rats ont été broyés dans l'azote liquide puis homogénéisés dans du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons protéiques ainsi préparés ont été soumis à une migration sur gels (0,1% SDS), puis les protéines ont été transférées sur des membranes de

nitrocellulose. Après saturation des membranes, elles ont été mises à incuber en présence d'anticorps primaires spécifiques puis secondaires se liant à ce premier anticorps et couplés à une peroxydase. Les protéines ont été ensuite révélées par luminescence grâce à un kit ECL (GE Healthcare).

1.2.2.5. Activités enzymatiques

Les activités des enzymes clés du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale (i.e., acétyl CoA déshydrogénase, cytochrome c oxydase et citrate synthase) ont été mesurées par spectrophotométrie sur les homogénats musculaires, comme décrit précédemment (Veerkamp *et al.*, 1983). Une unité enzymatique est alors définie comme étant la quantité qui catalyse l'oxydation d'1 mmol/min de cytochrome c pour la cytochrome c oxydase, la libération d'1 mmol/min de coenzyme A pour la citrate synthase, la disparition d'1 mmol/min de NADH pour l'acétyl CoA déshydrogénase. L'activité du complexe I a été dosée avec le *Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit* (MitoSciences #MS130).

1.2.2.6. ARNm par RT-PCR

La RT-PCR en temps réel a été réalisée sur les gènes codant pour les protéines d'intérêt. Après extraction des ARN musculaires (RNeasy Fibrous Tissue kit, Qiagen), des brins d'ADNc ont été obtenus grâce au Verso™ cDNA Kit (Qiagen). La RT PCR en temps réel a ensuite été réalisée avec des amorces (Quantitect ® Primer Assay, Qiagen) et un mix SYBR Green (QuantiTech SYBR Green PCR, Qiagen), en suivant les instructions du fabricant.

1.2.3. Résultats principaux

Protéomique différentielle : La Cit entraîne une surexpression significative (*t*-test) des constituants principaux du cytosquelette musculaire (α -actine, α -actinine 1, chaînes légères de la myosine 1 et 3, régulatrice 2 et chaîne lourde de la myosine 4) et de certaines enzymes

impliquées dans la glycogénolyse (i.e. glycogène phosphorylase) et la glycolyse (i.e., phosphoglucomutase 1, 6-phosphofructokinase, triosephosphate isomérase, β -énolase et pyruvate kinase isozymes M1/M2). Par ailleurs, l'expression d'enzymes du cycle de Krebs (i.e., isocitrate déshydrogénase et succinate déshydrogénase) et de la chaîne respiratoire mitochondriale (i.e., complexe NADH déshydrogénase, NADH ubiquinone oxydo-réductase) était significativement diminuée. Nous avons aussi trouvé une diminution de l'expression de la sous-unité 1 complexe activateur du protéasome et de la hsp 70 (protéine impliquée dans le stress oxydant).

Western blot : Les résultats obtenus par western blot ont confirmé ceux obtenus par la technique de protéomique différentielle.

Activités enzymatiques : L'activité enzymatique du complexe I était significativement augmentée chez les rats renourris avec de la Cit. Quant à l'activité de la citrate synthase (reflet du cycle de Krebs), sa diminution (-50%) chez les rats du groupe Cit vs les rats du groupe AL, n'atteignait pas la significativité. Les activités des autres enzymes étudiées, i.e. acétyl CoA déshydrogénase et cytochrome c oxydase n'étaient pas modifiées quel que soit le groupe considéré.

ARNm par RT-PCR : Globalement, le niveau d'expression des ARNm codant pour les protéines d'intérêt n'était pas affecté par les régimes.

1.2.4. Conclusion

La Cit entraîne une augmentation de l'expression des principales protéines myofibrillaires, ainsi qu'une modification coordonnée de l'expression de certaines enzymes, suggérant une réorientation du métabolisme énergétique (aérobie vers anaérobie). De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois une action de la Cit sur la protéolyse, par le biais

d'une sous-expression de la sous-unité 1 du complexe activateur du protéasome. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'ensemble de ces effets de la Cit ne serait pas transcriptionnel.

Quant à l'action de la Cit sur le complexe I, elle pourrait être liée à ses propriétés antioxydantes. En effet, l'amélioration du statut redox (par diminution de la production de ROS et/ou augmentation de la protection antioxydante) augmente l'activité du complexe I. Il convient toutefois de vérifier cette dernière hypothèse.

Effects of Citrulline on skeletal muscle proteome in malnourished aged rats

C. Faure¹, B. Morio^{2,3}, P. Chafey⁴, L. Cynober^{1,5}, C. Aussel^{1,6}, *C. Moinard¹

¹Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique (EA 4466), Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes, 75 270 Paris Cedex 6;

²INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand ;

³Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand ;

⁴Plate forme de Protéomique de l'Institut Cochin, INSERM, Paris;

⁵Service interhospitalier de Biochimie, Hôpitaux Cochin et Hôtel Dieu, AP-HP ;

⁶ Service interhospitalier de Biologie, Hôpital Emile Roux, AP-HP.

*Corresponding author : C. Moinard, ¹Département de Biologie Expérimentale, Métabolique et Clinique (EA 4466), Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

Tel: (+33) 1.53.73.99.80 Fax: (+33) 1.53.73.97.56

E-mail: christophe.moinard@parisdescartes.fr

ABSTRACT

Citrulline (Cit) modulates muscle protein metabolism through still unclear mechanisms of action. Those latter were investigated in this study using a proteomic approach. Male Sprague-Dawley rats, 23 months of age, were subjected to dietary restriction (50% of their spontaneous food intake) for 12 weeks and were then assigned to 3 groups: one group of rats was immediately euthanized at the end of the restriction period (R group) and 2 groups were refed (90% of their spontaneous intake) for one week with either a standard diet (Non Essential Amino Acid supplemented group, NEAA group), or a Cit-supplemented diet (CIT group). The NEAA-diet was isonitrogenous to the CIT-diet which was set at 5 g/kg/day. In parallel, other rats were fed *ad libitum* during the entire length of the experiment (AL group). *Tibialis* anterior muscle was immediately removed after euthanasia. Using the 2D-DIGE technique, expression of proteins from total extracts of *tibialis* was evaluated. We considered the proteins which expression differed by at least 50% between diets (t-test: p value ≤ 0.05). To confirm results of the proteomic approach regarding the effects of citrulline, protein expression (western blot) and gene expression of the related-genes (RT-PCR) were assessed on a few of the proteins of interest. Maximal activities of the key-enzymes involved in mitochondrial functioning were also determined.

Cit supplementation results in a significative overexpression of the main myofibrillar constituents and of a few enzymes implicated in glycogenolysis and glycolysis. Conversely, the expression of oxidative enzymes from Krebs cycle and mitochondrial respiratory chain was significantly decreased using both proteomic approach and western blot technic. However, maximal activities of key-enzymes of mitochondrial metabolism were not significantly affected, except for complex 1 which presented an increased activity in the Cit-refed rats. We also found Cit decreased expression of a few cytoskeletal components, of proteasome activator complex subunit 1 and of Heat Shock 70 kDa protein. Moreover, results of the RT-PCR analysis show Cit does not act at the transcriptional level.

Cit increases expression of the main myofibrillar proteins and seems to induce a switch in muscle energy metabolism, from aerobia towards anaerobia.

Key words : amino acids, proteome, caloric restriction, ageing

ABBREVIATIONS

AAs : amino acids

Cit: citrulline

AL: *ad libitum*

R : restricted

NEAA : non-essential amino acids

isoN : isonitrogenous

MyHC: myosin heavy chains

hsp70 : heat shock 70kDa protein

IS : Internal Standard

MM : molecular mass

pI : isoelectric point

ROS: reactive oxygen species

1. INTRODUCTION

Citrulline (Cit) has been under-estimated of nutritional point of view for a long time as it is a non-protein amino acid (AA) (Curis *et al.*, 2005), but recent studies have shown its implication in protein metabolism. It has been shown Cit is a player in the control of nitrogen homeostasis (Moinard & Cynober, 2007; Cynober *et al.*, 2010). In elderly malnourished rats, Cit supplementation is able to restore nitrogen balance, generate large amounts of arginine in short bowel syndrome, and increase muscle protein content (+20%) as well as muscle protein synthesis (+90%) (Osowska *et al.*, 2004; Osowska *et al.*, 2006; Moinard & Cynober, 2007). Moreover, effect of Cit on muscle protein synthesis has been confirmed in young healthy subjects fed a hypoprotein diet (Jourdan *et al.*, 2008). Cit action on muscle protein synthesis passes through the stimulation of proteins involved in the mTOR transduction pathway (Moinard *et al.*, 2007b). We also demonstrated that Cit improves muscle mass, motor activity and maximal tetanic isometric force in malnourished aged rats, when administered for a short-time period (Faure *et al.*, 2008).

So, we know benefits due to Cit administration on skeletal muscle of malnourished aged rats, but its mechanism of action remains undetermined. Therefore, we investigated it *via* a proteomic approach. The original aim of the present study was to target proteins which expression was modified following the administration of Cit in malnourished aged rats.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Twenty-three-month-old male Sprague-Dawley rats (Charles-River, L'Arbresle, France) were housed individually at 20-23°C with an alternate 12-hour-light-dark-cycle. They had free access to water. During the 3-week acclimatization period all rats were fed *ad libitum* (AL) with a standard diet containing 17% (w/w) proteins, 3% (w/w) lipids, 59% (w/w) carbohydrates, 21% (w/w) water, fibres, vitamins and minerals (Safe, Villemoisson-sur-Orge, France). Daily spontaneous intakes were recorded.

Animal care complied with the French regulations for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (D 2001-486) and with European Community

regulations (Official Journal of the European Community, L538 12:18:1986). The experimental protocol was approved by the local ethics committee for animal research (registered number P2.CM.035.07).

2.2. Study design

All the AAs used in this experiment were purchased from Sigma (Saint Quentin, Fallavier, France) except for Cit which was a generous gift from Kyowa Hakko (Tokyo, Japan). Cit and NEAA were used carefully mixed with the standard diet (see below for details).

After the acclimatization period, the rats were randomised into the 4 following groups (figure 1):

- AL group: the rats (n=8) were fed AL during 13 weeks and then killed.
- Restricted group (R): the rats (n=6) underwent a dietary restriction for 12 weeks (50% of their spontaneous intakes recorded during the acclimatization period) (Walrand *et al.*, 2000; Osowska *et al.*, 2006) and were killed at the end of this period of restriction.
- CIT group: after 12 weeks of dietary restriction, the rats (n=8) were refed for one week with a standard diet supplemented with 5 g Cit/kg/day, which represents 1.2 g N/kg/day, and then killed. This dose of Cit is the extrapolation of doses used in humans taking into consideration that the metabolic rate and nitrogen requirements of rats are 10 times those of humans (Colomb *et al.*, 1995). Food was limited to 90% of spontaneous intake to ensure the rats ate their entire ration and hence all rats ate the same amounts of food (Walrand *et al.*, 2000).
- Non-essential amino acid (NEAA) group: after 12 weeks of dietary restriction, the rats (n=7) were refed for one week with a standard diet supplemented with NEAAs (alanine, glycine, proline, histidine, aspartate and serine, in equimolar ratio) isoenergetic and isonitrogenous to the Cit diet, i.e. 1.2 g N/kg/day.

On the last day of the experiment, the *tibialis* anterior muscle was rapidly removed just after the rat was killed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.3. 2D-DIGE Proteomic analysis

Immobiline DryStrip (18 cm, pH 4–7), IPG Buffer pH4-7, cyanine dyes (Cy2, Cy3 and Cy5), DryStrip cover fluid, glycerol and the 2-D Clean-Up kit were from GE Healthcare.

Thiourea and CHAPS were from Sigma. Urea, Bio-Safe Coomassie, DTT and Bradford assay kit were from Bio-Rad. SDS was from Fluka. All other chemicals and biochemicals used were of analytical grade.

2.3.1. Muscle protein extraction

Tibialis anterior muscles of 4 animals in each of the previously described groups of rats (i.e., AL, R, NEAA and Cit) were used to perform proteomic analysis and define different protein expression profilings. Frozen *tibialis* anterior muscles of rats were crushed in liquid nitrogen and solubilised in 10V of lysis buffer containing 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 50mM DTE. After centrifugation (100,000g for 45 min at 6 °C) the supernatants were collected and, in order to remove DTT, all samples were treated with 2D Clean-Up kit (GE healthcare) according to the manufacturer's instructions. The resultant dry pellets were resuspended into lysis buffer without DTT, and the pH was set to 8.5 with 1.5 M Tris-base. Protein concentration of samples was estimated according to the manufacturer's instructions using a commercial Bradford reagent (Quick Start Bradford protein assay, Bio-Rad) and samples were stored at -80°C until use.

Quadruplicate samples from the four groups were independently prepared as described above and were used for the DIGE analysis. Samples were labelled either with Cy3 or Cy5 fluorescent dyes as indicated (Tonge *et al.*, 2001) and an internal standard prepared by mixing equal amount of all samples were labelled with Cy2 fluorescent dye. These labelled samples were then combined for 2D DIGE analysis as described in table I.

2.3.2. Two-dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was performed as described previously (Gorg *et al.*, 2000). Briefly, pH 4-7 IPG strips 18 cm (GE Healthcare) were rehydrated overnight with 150 µg labelled protein samples mixed with rehydration buffer [8 M urea, 2 M thiourea, 10 mM DTT, 2% (w/v) CHAPS, 1.0% (v/v) pH 4-7 IPG buffer and trace of bromophenol blue] in a final volume of 350 µL. Isoelectric focusing was performed at 20°C using IPGphor3 (GE Healthcare) for a total of 50 kVh. The IPG strips were equilibrated for 15 min at room temperature with gentle agitation in equilibration buffer containing 6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 8.8 and 1% (w/v) DTT and subsequently for 15 min in the same buffer containing 4.7% (w/v) iodoacetamide instead of DTT. Equilibrated IPG strips were rinsed with

running buffer [25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% (w/v) SDS], placed onto homemade 8-18% gradient polyacrylamide gels and overlaid with agarose solution [0.5% low-melting agarose and trace of bromophenol blue in running buffer]. Gels were run overnight at 20°C in the EttanDalt II system (GE Healthcare) at 2.5 W/h and were stopped when the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel. All electrophoresis procedures were performed in the dark.

2.3.3. Visualization of proteins and image analysis

The Cy2, Cy3 and Cy5 components of each gels were individually imaged using a Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare). Images were scanned using optimal excitation/emission wavelength for each DIGE fluor (Cy2 488/520 nm; Cy3 532/580 nm; Cy5 633/670 nm).

Relative quantification of spot intensities and statistical evaluation were carried out with DeCyder software 6.5 (GE Healthcare). The DeCyder differential in-gel analysis (DIA) module allowed spot detection and quantification of the DIGE images. The DeCyder biological variation analysis (BVA) module was then used to perform gel to gel matching of spots detected in the different samples labelled with Cy3 or Cy5 and the internal standard labelled with Cy2. Groups were compared two by two. Normalized results relative to the internal standard for each spot are compared across all gels that allowed relative expression ratio and provided statistical data for each differentially expressed spot. Protein spot abundance ratios larger than 1.4 or smaller than -1.4 was set as a threshold. Only spots with a Student's *t*-test *p* value less than 0.05 in the comparison of log standardized abundance values of one group compared to another one, were retained for protein identification.

2.3.4. Protein identification by mass spectrometry

A semi-preparative 2D-gel was made as described above, except that IPG strip was rehydrated with 400 µg protein samples and isoelectric focusing was performed for a total of 100 KV/h. After electrophoresis, the gel was fixed in a solution containing 30% (v/v) ethanol and 2% (v/v) phosphoric acid for 2 x 30min, fixed overnight with the same solution, washed 3 x 10 min with 2% (v/v) phosphoric acid and then stained for 72h with 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 12% (w/v) ammonium sulfate, 18% (v/v) ethanol and 2% (v/v) phosphoric acid.

Preparative gel was washed in Milli-Q water scanned with ImageScanner (GE healthcare). The image of the preparative gel was matched to those of analytical gels, and the relevant spots were selected and manually excised from the gel.

- Mass spectrometry: in-gel trypsination

In-gel digestion was carried out with trypsin as described by Schevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 2006) with minor modifications and using for all steps a Freedom EVO 100 digester/spotter robot (Tecan, Männedorf, CH).

Spots were first destained two times with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% acetonitrile (ACN) for 45 minutes at 22°C and then dried using 100% ACN for 15 minutes. Protein spots were then reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT for 1 hour at 60°C and then alkylated by 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at 22°C. Gels pieces were washed twice with 25 mM ABC and finally shrunk two times with 100% ACN for 15 minutes and dried using 100% ACN for 10 minutes. Bands were completely dehydrated after one hour at 60°C. Gel pieces were incubated with 13 µl of Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, WI, USA; 12.5 µg/ml in 40 mM ABC-10% ACN pH 8.0) overnight at 40°C. After digestion, peptides were washed with 30 µl of 25 mM ABC, shrunk with 100% ACN and extracted twice with a mixture of 50% ACN-5% formic acid (FA). Extracts were dried using a vacuum centrifuge (Eppendorf). Finally, peptides were desalted using C₁₈-ZipTips (Millipore) using two elutions, first with 50% ACN-5% FA and then using 80% ACN-5% FA. Pooled elutions were let dried at ambient temperature.

- Mass spectrometry: identification

For MS and MS/MS analysis, peptides were redissolved in 4 µl of alpha-CHCA (5 mg/ml in 50% ACN-0.1% TFA). One microliter and a half of each sample was spotted directly onto a MALDI plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Droplets were allowed to dry at room temperature. The sample analyses were performed using a MALDI-TOF 4800 mass spectrometer (Applied Biosystems). Spectra acquisition and processing was performed using the 4000 series explorer software (ABI) version 3.5.28193 in positive reflectron mode at fixed laser fluency with low mass gate and delayed extraction. External plate calibration was performed using 4 calibration points spotted onto the 4 corners of the plate using a mixture of five external standards (PepMix 1, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France). Peptide masses were acquired by steps of 50 spectra for the range of 900 to 4000Da. MS spectra were summed from 500 laser

shots from an Nd-YAG laser operating at 355 nm and 200Hz. After filtering tryptic-, keratin- and matrix-contaminant peaks up to 15 parent ions were selected for subsequent MS/MS fragmentation according to mass range, signal intensity, signal to noise ratio, and absence of neighbouring masses in the MS spectrum. MS/MS spectra were acquired in 1 kV positive mode and 1000 shots were summed by increment of 50. Database searching was carried out using Mascot version 2.2 (MatrixScience, London, UK) *via* GPS explorer software (ABI) version 3.6 combining MS and MS/MS interrogations on *Rattus norvegicus* proteins from Swissprot databank containing 7227 entries (ExPASy Proteomics Server, 2009) and NCBI nr databank containing 68366 entries (National Center for Biotechnology Information, 2009). The search parameters were as follows: carbamidomethylation as a variable modification for cysteins and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed tryptic cleavage was permitted and mass accuracy tolerance of 30 ppm for precursors and 0.3 Da for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e. <5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches. Under our identification criteria, no result was found to match to multiple members of a protein family.

2.4. Western Blot Analysis

In order to confirm MALDI-TOF protein identification of distinct muscle proteins, as revealed by DIGE analysis, immunoblotting of selected proteins utilizing highly specific primary antibodies were performed. As the main differences in protein expression profiling were observed between AL and Cit-refed rats, this checking was only made for these two groups of rats (n=4 in each group). Frozen *tibialis* muscles were crushed in liquid nitrogen and homogenized at 100 mg frozen tissue/1 ml of lysing buffer containing protease inhibitor (Laemmli, 1970). Samples of soluble proteins (37.5 µg) were subjected to 10-14% PAGE containing 0.1% SDS using 30mA/gel. Protein transfer and equal loading of proteins were visualized on the membranes with Ponceau S solution. Blocked immunoblots were incubated with primary polyclonal antibodies (SantaCruz Biotechnology) raised against rat proteins and then with a peroxidase-conjugated anti-rabbit/mouse/goat IgG secondary antibody (SantaCruz Biotechnology) as previously described (Levillain *et al.*, 2004). Antibody binding was revealed using a chemiluminescence (ECL) Western Blotting Kit.

2.5. RNA extraction and real time RT-PCR

Real time RT-PCR was performed on the same two groups (i.e., AL and Cit) as for western blot analysis, for the genes related to the proteins of interest.

Muscle RNA of Cit-refed-rats and AL fed rats was extracted with the RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen) and the quality of total RNA monitored by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) following the manufacturer's instructions. Generation of cDNA was performed with the VersoTM cDNA Kit (Qiagen). RT-PCR was carried out using SDS software on the Applied Biosystems 7900 with QuantiTect® Primer Assay and QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) as recommended by the manufacturers. Gene of reference used was Psmc1 (proteasome activator subunit 1).

2.6. Measurement of Enzymes Activities

Maximal activity of key enzymes of Krebs cycle and mitochondrial respiration (i.e., acetyl CoA dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase and citrate synthase) was assayed spectrophotometrically on the above muscle homogenates as described previously (Veerkamp *et al.*, 1983). One unit of enzyme is defined as the amount that catalyzes the oxidation of 1 mmol/min of cytochrome *c* for cytochrome *c* oxidase (at 25°C), the liberation of 1 mmol/min of coenzyme A for citrate synthase (at 25°C), and the disappearance of 1 mmol/min of NADH for acetyl CoA dehydrogenase (at 30°C). One unit of enzyme is defined as the amount that catalyzes the oxidation of 1 mmol/min of cytochrome *c* for cytochrome *c* oxidase (at 25°C), the liberation of 1 mmol/min of coenzyme A for citrate synthase (at 25°C), and the disappearance of 1 mmol/min of NADH for acetyl CoA dehydrogenase (at 30°C). Complex I activity was performed with Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit (MitoSciences #MS130). Briefly Complex I is immunocaptured and immuno-precipitated in active form on the dipstick. Secondly, the dipstick is immersed in Complex I activity buffer solution containing NADH as a substrate and nitrotriazolium blue (NBT) as the electron acceptor. Immunocaptured Complex I oxidizes NADH and the resulting H⁺ reduces NBT to form a blue-purple precipitate at the Complex I line on the dipstick. The signal intensity of this precipitate corresponds to the level of Complex I enzyme activity in the sample. The signal intensity is analyzed by a standard imaging system.

2.7. Statistics

Protein spot abundance ratios larger than 1.4 or smaller than -1.4 was set as a threshold. Only spots with a Student's *t*-test *p* value less than 0.05 in the comparison of log standardized abundance values of one group mutant compared to another one, were retained for protein identification.

Western blot analysis was visually made to confirm results of proteomics.

All comparisons of mRNA expression levels between the groups were performed using Student *t*-test (Statview software). Genes were identified as differentially expressed if they showed a fold-change of at least 1.5 with a *p* value lower than 0.05.

Comparisons between sets of data of enzymes activities were made using Student *t*-test. The Statview software was used. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Recent studies have shown that Cit stimulates muscle protein synthesis (Osowska *et al.*, 2006) and improves muscle mass and function in malnourished aged rats, at the post-absorptive state (Faure *et al.*, 2008). However the mechanism of action of Cit is unclear and we investigated it *via* a proteomic approach.

Selected proteins checked by western blot confirmed the results obtained by MALDI-TOF protein identification (figure 2).

3.1. Effect of Citrulline on myofibrillar proteins expression

As indicated in table II, Cit induces a significant overexpression (T-test) of the main myofibrillar constituents. Indeed, short-term Cit administration in malnourished aged rats *vs* AL fed rats results in an overexpression of α -actin (+1.8), α -actinin-1 (+1.4), myosin light chain 1 (+1.5 and +1.6), regulatory light chain 2 (+2.2, +2.0), light chain 3 (+1.5 and +1.4) and heavy chain 4 (+1.4). However, expression of an isoform of the myosin regulatory light chain 2 was decreased in the Cit refed rats (-2.5).

A few studies (Nair, 1995; Balagopal *et al.*, 1997; Piec *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2007; Lombardi *et al.*, 2009; Capitanio *et al.*, 2009; Donoghue *et al.*, 2010) analyzed the effect of age on rat skeletal muscle proteome and found important modifications in contractile proteins (actin, myosin) likely accounting for dysfunction in old muscle force generation. Age-related decline of myosin heavy chain synthesis, constituting 25 to 30% of muscle proteins (Balagopal *et al.*, 1994) contributes to the decline in muscle mass and contractile function in the elderly (Balagopal *et al.*, 1997; D'Antona *et al.*, 2003). We have shown in a previous study (Faure *et al.*, 2008) using the same model of malnourished aged rats, an improvement of muscle mass, motor activity and maximal tetanic isometric force, when supplemented with Cit. In the present study, we have found for the first time that supplementing malnourished aged rats with a specific AA increases expression of the main myofibrillar components. Our data suggest that Cit is able to increase myofibrillar proteins expression at an efficient level to improve contractile functions and muscle mass.

3.2. Effects of Citrulline on cytoskeletal protein expression

We have shown in the Cit-refed rats a decrease in the expression of cytoskeletal components (table II): Cit decreases the expression of gelsolin (-1.4), profilin-2 (-1.4), which are proteins involved in the depolymerization of actin filaments; Cit also decreased the expression of tubulin alpha-1B (-1.6) and beta-2C chains (-1.5) *vs.* AL rats.

An increase in the expression of gelsolin (Piec *et al.*, 2005) and of cytoskeletal tubulin in aged skeletal muscle (Piec *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2009) has been observed in other studies. Tubulins are positioned between myofibrils, as well as associated with the sarcolemma, Golgi complex, endosomes and nuclei. It was hypothesized that aged muscles may increase expression of cytoskeleton networks as a compensation for perturbations in myofibrillar structures and to avoid extensive damages to myofibers (Piec *et al.*, 2005). In contrast to myofibrillar components, muscles of old animals up-regulates many proteins of the intermediate filament, microtubule and microfilament cytoskeleton (Piec *et al.*, 2005). As myofibrillar components expression is increased by Cit, cytoskeletal components would not need anymore to compensate the perturbations of sarcomeric actomyosin due to ageing and could thus be underexpressed in Cit-refed rats for this reason. These latter results support the idea that Cit restores a normal expression of cytoskeleton network which is impaired in the elderly (Piec *et al.*, 2005).

3.3. Effect of Citrulline on enzymes of energetic metabolism

Our results also suggest that Cit modulates muscle physiology as modifications in the expression of enzymes involved in energy metabolism (i.e. carbohydrate and mitochondrial metabolisms) were observed in Cit-refed rats (table III). Actually, these results were not anticipated.

3.3.1. Effect of Citrulline on enzymes of carbohydrate metabolism

A few enzymes involved in glycogenolysis (i.e. glycogen phosphorylase (1.8, 1.9, 1.8, 1.7) and glycolysis (i.e., phosphoglucumutase 1 (1.7 and 1.9), 6-phosphofructokinase (1.4), triosephosphate isomerase (1.4), β -enolase (1.7, 1.5, 1.6) and pyruvate kinase isozymes M1/M2 (1.5)) were overexpressed in the Cit-refed rats *vs.* AL fed rats.

Glycogen phosphorylase (Gelfi *et al.*, 2006), phosphoglucomutase, triosephosphate isomerase (Gelfi *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*, 2009), β -enolase (Gelfi *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*, 2009) and pyruvate kinase are decreased in old skeletal muscle (Piec *et al.*, 2005; Capitanio *et al.*, 2009). The decreased reliance on carbohydrate and glucose metabolism in aged skeletal muscle seems to be reversed by Cit.

3.3.2. Effect of Citrulline on expression of mitochondrial enzymes

Conversely, expression of Krebs cycle enzymes (i.e., isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha (-1.4) and succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit (-1.6 and -1.4)) and of mitochondrial respiration chain (i.e., NADH dehydrogenase [ubiquinone] Fe-S protein 3 (-1.5), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2 (-1.5) and NADH ubiquinone oxydo-reductase 75kDa subunit (-1.5)) was significantly decreased in the Cit-refed rats *vs.* AL fed rats.

Studies investigating the effect of age on Krebs cycle enzymes and mitochondrial respiration are somewhat controversial. Indeed, a recent study has shown proteins involved in oxidative metabolism were more abundant in elders than in youngs (Gelfi *et al.*, 2006; Capitanio *et al.*, 2009), whereas other studies have shown a depressed mitochondrial metabolism in aged skeletal muscle (Piec *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2009). A study which has shown an increased aerobic metabolism has found an overexpression of isocitrate dehydrogenase in aged muscles (Capitanio *et al.*, 2009). Cit, in our study, decreases isocitrate dehydrogenase expression. This finding is corroborated by the significant decrease in citrate synthase activity in the Cit-refed rats *vs.* AL fed rats.

We have recently shown (Moinard *et al.*, 2009) that a 3-month-Cit supplementation modifies body composition of aged rats. In this latter study, mass and protein content in a glycolytic muscle were significantly increased and body fat was decreased in the Cit-supplemented rats. In another study, it has also been shown that Cit administration (watermelon juice) limited fat accretion in Zucker Diabetic Fatty rats (Wu *et al.*, 2007). It is well-known in the literature that energy metabolism is linked to muscle type. Combined with these other studies, our results on enzymes expression suggest that Cit modifies energy metabolism: it seems that Cit reorientates *tibialis* metabolism to a mainly anaerobic way.

The maximal activity of the key oxidative enzyme of the respiratory chain, the cytochrome c oxydase, was not significantly affected by the diets. However, complex 1 catalytic activity was significantly increased in the Cit-refed rats (table IV). Our personal data showed that complex 1 catalytic activity is increased when cellular redox status is improved, by decreasing reactive oxygen species (ROS) and/or by increasing antioxidant protection. The specific increase in complex 1 catalytic activity may thus be the result of an improved cell physiology in Cit-refed rats vs. AL fed rats, although the protein expression of some of its subunits is decreased.

3.4. Effect of Citrulline on expression of proteasome activator complex subunit 1

A novel finding important to notice is the lower expression of proteasome activator complex subunit 1 in the rats supplemented with Cit (-1.8) (table V). The effect of Cit on muscle protein synthesis is now established in aged rats (Osowska *et al.*, 2006; Moinard *et al.*, 2007a; Moinard *et al.*, 2007b; Jourdan *et al.*, 2008) but, to our knowledge, only 3MH/creatinine has been explored to evaluate myofibrillar proteolysis, which remained unchanged in this situation (Osowska *et al.*, 2006). Here, we have shown for the first time that Cit could also act as an inhibitor of proteolysis by modulating the expression of the proteasome activator complex subunit 1. The elderly appear to have slightly elevated proteolysis in a fasting state relative to the young (Volpi *et al.*, 2001) and the ubiquitin-proteasome-proteolytic pathway is predominantly responsible for the degradation of skeletal muscle proteins (Smith *et al.*, 2005). Cit, by inhibiting the expression of proteasome activator complex subunit 1, may thus reduce the slightly increased muscle proteolysis that occurs in the elderly at rest. Among the other nutritional strategies tested in this context, only supplementation with leucine showed reduction of the proteasome activities. Indeed, short-term supplementation of meals with 5% leucine has been demonstrated to completely reverse age-related increases in proteasome activities (Combaret *et al.*, 2005).

mTOR, protein complex implied in the stimulation of muscle protein synthesis, also acts as an anti-atrophy checkpoint as it blocks upregulation of MuRF1 and MAFbx (Glass, 2005). We have shown in a previous study that action of Cit on muscle protein synthesis passes through the stimulation of mTOR (Moinard *et al.*, 2007b). Both MuRF1 and MAFbx encode for components of the ubiquitin proteasome pathway (Bodine *et al.*, 2001). Thus, it could be suggested that Cit decreases the expression of proteasome activator complex subunit 1, through activating mTOR which thus downregulates MuRF1 and MAFbx.

Moreover, myosin heavy chains (MyHC) were shown to be degraded by a ubiquitin/proteasome mediated pathway (Schulze *et al.*, 2005). Decreased expression of ubiquitin proteasome complex by Cit may thus limit the degradation of MyHC and that could explain the overexpression of MyHC in Cit-refed rats.

3.5. Effect of Citrulline on Heat Shock 70kDa protein

Cit administration results in our study in a diminished expression of heat shock 70kDa protein (hsp70) (-1.6) (table V). A large increase of hsp70 has been found in old skeletal muscle (Piec *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2007). Expression of hsp70 is increased in situations of stress, in order to protect cells and organs (Lee *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2010). Cit is known for its anti-oxidant capacity (Akashi *et al.*, 2001) and may therefore decrease oxidative stress in skeletal muscle. Then, it could be strongly suggested the decreased stress due to Cit administration induces a least expression of hsp70. Moreover, it has been shown hsp70 is partly responsible of declining muscle (Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010). The underexpression of hsp70 in Cit refed rats could participate to the attenuation of the age-related declining muscle. Indeed, we observed an improvement of muscle mass and function by Cit in the same model (Faure *et al.*, 2008).

3.6. Molecular target of Citrulline

Phenomena such as downregulation of transcriptional factors, due to a reduction in all types of RNAs with advancing age and abnormal protein modification may be involved in the age related decline in protein synthesis (Shikama & Brack, 1996). We hypothesized that Cit effect on protein expression could be due to modulation of transcriptional process. As we were willing to elucidate how Cit modulates these proteins expression, RT-PCR was performed for the genes related to the proteins of interest. Results did not show any effect of Cit at a transcriptional level, suggesting its actions passes through traductional and/or post-traductional regulation, since indeed Cit has an action on protein synthesis (Osowska *et al.*, 2006; Moinard *et al.*, 2007a; Moinard *et al.*, 2007b). However, the delay between a transcriptional action and the time of evaluation do not allow having a definitive conclusion.

4. CONCLUSION

Recent proteomic screening investigating the effect of age on skeletal muscle fibers in rats observed a differential expression pattern for contractile proteins, metabolic factors, regulatory components, heat shock elements (O'Connell *et al.*, 2007), proteins related to energy metabolism and mitochondrial pathways (Lombardi *et al.*, 2009; Donoghue *et al.*, 2010). Our findings strongly suggest Cit could reverse the severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle and shift the energy metabolism from aerobic to anaerobic pathways. Moreover, concerning the action of Cit on mitochondria activity, a possible explanation could be related to its antioxidant properties.

Acknowledgements:

This work was partly supported by APPERT Institute and Cécile Faure is supported by a grant from the Fondation Le Lous.

Reference List

- Akashi K, Miyake C & Yokota A (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett* **508**, 438-442.
- Balagopal P, Ljungqvist O & Nair KS (1997) Skeletal muscle myosin heavy-chain synthesis rate in healthy humans. *Am J Physiol* **272**, E45-E50.
- Balagopal P, Nair KS & Stirewalt WS (1994) Isolation of myosin heavy chain from small skeletal muscle samples by preparative continuous elution gel electrophoresis: application to measurement of synthesis rate in human and animal tissue. *Anal Biochem* **221**, 72-77.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, *et al.* (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
- Capitanio D, Vasso M, Fania C, Moriggi M, Vigano A, Procacci P, Magnaghi V & Gelfi C (2009) Comparative proteomic profile of rat sciatic nerve and gastrocnemius muscle tissues in ageing by 2-D DIGE. *Proteomics* **9**, 2004-2020.
- Colomb V, Leturque A, Guihot G, Loizeau M, Lavie S, Colomer S, Ricour C & Girard J (1995) Route of nutrient delivery affects insulin sensitivity and liver glucose transporter expression in rat. *Am J Physiol* **269**, E827-E833.
- Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D (2005) A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* **569**, 489-499.
- Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S & Cynober L (2005) Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* **29**, 177-205.
- Cynober L, Moinard C & De Bandt JP (2010) The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: a new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game? *Clin Nutr* **29**, 545-551.
- D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B & Bottinelli R (2003) The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* **552**, 499-511.
- Donoghue P, Staunton L, Mullen E, Manning G & Ohlendieck K (2010) DIGE analysis of rat skeletal muscle proteins using nonionic detergent phase extraction of young adult versus aged gastrocnemius tissue. *J Proteomics* **73**, 1441-53.
- ExPASy Proteomics Server (2009). www.expasy.org.

- Faure C, Raynaud-Simon A, Le Plenier S, Ferry A, Dauge V, Aussel C, Cynober L & Moinard C (2008) Effets de la citrulline et de la leucine sur la fonctionnalité musculaire chez le rat âgé dénutri. *Nutr Clin Metabol* **22**, 145.
- Gelfi C, Vigano A, Ripamonti M, Pontoglio A, Begum S, Pellegrino MA, Grassi B, Bottinelli R, Wait R & Cerretelli P (2006) The human muscle proteome in aging. *J Proteome Res* **5**, 1344-1353.
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1974-1984.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R & Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.
- Jourdan M, Nair KS, Ford C, Shimke J, Ali B, Will B, Marc J, Aussel C & Cynober L (2008) Citrulline stimulates muscle protein synthesis at the post-absorptive state in healthy subjects fed a low protein diet. *Clin Nutr* **3**, 11-12.
- Kim JS, Wilson JM & Lee SR (2010) Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. *J Nutr Biochem* **21**, 1-13.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee CE, McArdle A & Griffiths RD (2007) The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin Nutr* **26**, 524-534.
- Levillain O, Hus-Citharel A, Garvi S, Peyrol S, Reymond I, Mutin M & Morel F (2004) Ornithine metabolism in male and female rat kidney: mitochondrial expression of ornithine aminotransferase and arginase II. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F727-F738.
- Lombardi A, Silvestri E, Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F, de LP & Moreno M (2009) Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J Proteomics* **72**, 708-721.
- Moinard C & Cynober L (2007) Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis. *J Nutr* **137**, 1621S-1625S.
- Moinard C, Jourdan M, Walrand S, Le Plenier S, Boirie Y & Cynober L (2007a) La citrulline exerce un effet direct sur la synthèse protéique musculaire. *Nutr Clin Metabol* **21**, 31-32.
- Moinard C, Le Plenier S, Kharchi C, Cynober L & Raynaud-Simon A (2009) Un apport prolongé en citrulline modifie profondément la composition corporelle du rat âgé sain. *Nutr Clin Metabol* **23**, 28.

- Moinard C, Le Plenier S, Perret C & Cynober L (2007b) La Citrulline module la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via l'activation de S6R et de P70S6 kinase1. *Nutr Clin Metabol* **21**, 32.
- Nair KS (1995) Muscle protein turnover: methodological issues and the effect of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50**, 107-112.
- National Center for Biotechnology Information (2009). www.ncbi.nlm.nih.gov.
- O'Connell K, Gannon J, Doran P & Ohlendieck K (2007) Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med* **20**, 145-153.
- Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L & Moinard C (2006) Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E582-E586.
- Osowska S, Moinard C, Neveux N, Loi C & Cynober L (2004) Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut* **53**, 1781-1786.
- Piec I, Listrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG & Bechet D (2005) Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* **19**, 1143-1145.
- Schulze PC, Fang J, Kassik KA, Gannon J, Cupesi M, MacGillivray C, Lee RT & Rosenthal N (2005) Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ Res* **97**, 418-426.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV & Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860.
- Shikama N & Brack C (1996) Changes in the expression of genes involved in protein synthesis during *Drosophila* aging. *Gerontology* **42**, 123-136.
- Smith HJ, Mukerji P & Tisdale MJ (2005) Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res* **65**, 277-283.
- Taylor L, Midgley AW, Christmas B, Madden LA, Vince RV & McNaughton LR (2010) The effect of acute hypoxia on heat shock protein 72 expression and oxidative stress in vivo. *Eur J Appl Physiol* **109**, 849-55.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I & Davison M (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377-396.
- Veerkamp JH, Van Moerkerk HT, Glatz JF & Van H, V (1983) Incomplete palmitate oxidation in cell-free systems of rat and human muscles. *Biochim Biophys Acta* **753**, 399-410.

- Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Wolfe RR (2001) Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA* **286**, 1206-1212.
- Walrand S, Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Chassagne J, Raul F, Normand B, Farges MC, Beaufriere B, Vasson MP & Cynober L (2000) Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats. *Am J Clin Nutr* **72**, 816-824.
- Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P, Siddiq M, Dolan KD, Kelly KA, Heaps CL & Meininger CJ (2007) Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* **137**, 2680-2685.

Fig. 1 : Experimental design.

AL, rats fed *ad libitum* during 12 weeks; R, rats restricted (50% of their spontaneous intake) for 12 weeks; CIT, and NEAA, rats restricted for 12 weeks and then refed for 1 week with respectively a Cit- or a NEAA-enriched diet. Diets were isonitrogenous and isoenergetic.

Fig. 2 : Western blot.

In order to confirm MALDI-TOF protein identification of distinct muscle proteins, as revealed by DIGE analysis, immunoblotting of selected proteins utilizing highly specific primary antibodies were performed. As the main differences in protein expression profiling were observed between AL and Cit-refed rats, this checking was only made for these two groups of rats.

2a. myosin heavy chain 4 (222kDa)

2b. α -actin (45kDa)

2c. α -actinin (100kDa)

2d. profilin (15kDa)

2e. glycogene phosphorylase (98kDa)

2f. 6-phosphofructokinase (85kDa)

Table I : Proteomic experimental procedure.

Samples from the four groups were independently prepared and used for the DIGE analysis. Samples were labelled either with Cy3 or Cy5 fluorescent dyes as indicated (Tonge *et al.*, 2001) and an internal standard prepared by mixing equal amount of all samples were labelled with Cy2 fluorescent dye. These labelled samples were then combined for 2D DIGE analysis as indicated in this table. IS : Internal Standard.

Table II : Proteomic profiling of Cit-refed rats on myofibrillar and cytoskeletal components expression.

Protein spot abundance ratios larger than 1.4 or smaller than -1.4 was set as a threshold. Only spots with a Student's *t*-test *p* value less than 0.05 in the comparison of log standardized abundance values of one group mutant compared to another one, were retained for protein identification. MM: molecular mass; pI: isoelectric point. The several spots matching for a same protein can be explained by different post-translational modifications.

Table III : Proteomic profiling of Cit-refed rats on energetic metabolism enzymes expression.

Protein spot abundance ratios larger than 1.4 or smaller than -1.4 was set as a threshold. Only spots with a Student's *t*-test *p* value less than 0.05 in the comparison of log standardized abundance values of one group mutant compared to another one, were retained for protein identification. MM: molecular mass; pI: isoelectric point. The several spots matching for a same protein can be explained by different post-translational modifications.

Table IV : Enzymes maximal activity.

Data are expressed as mean \pm sem. Comparisons between sets of data were made using Student *t*-test. The Statview software was used. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

Table V : Proteomic profiling of Cit-refed rats on other proteins expression.

Protein spot abundance ratios larger than 1.4 or smaller than -1.4 was set as a threshold. Only spots with a Student's *t*-test *p* value less than 0.05 in the comparison of log standardized abundance values of one group mutant compared to another one, were retained for protein identification. MM: molecular mass; pI: isoelectric point. The several spots matching for a same protein can be explained by different post-translational modifications.

Table VI : RT-PCR analysis of mRNA expression.

Values indicated are the ratio of the concentrations between the gene of interest (i.e., Acta1 : α -actin1; Actn1 : α -actinin-1; Gsn : gelsolin; IDH3A : α -isocitrate dehydrogenase 3 (NAD⁺); Myh4 : myosin heavy chain 4; Myl1: myosin light chain 1; Pfk: phosphofructokinase; Pfn2 : profilin 2; Pygm : glycogen phosphorylase) and the reference gene (i.e., Psme1: proteasome activator subunit 1).

* significantly different from the AL group (Student *t*-test: $p < 0.05$).

Fig. 1 :

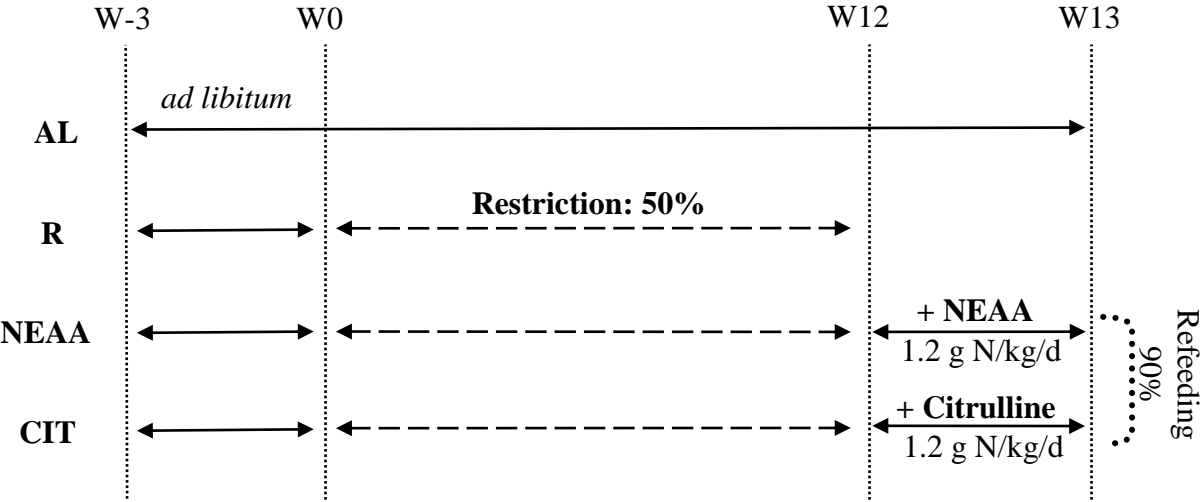


Fig. 2 :

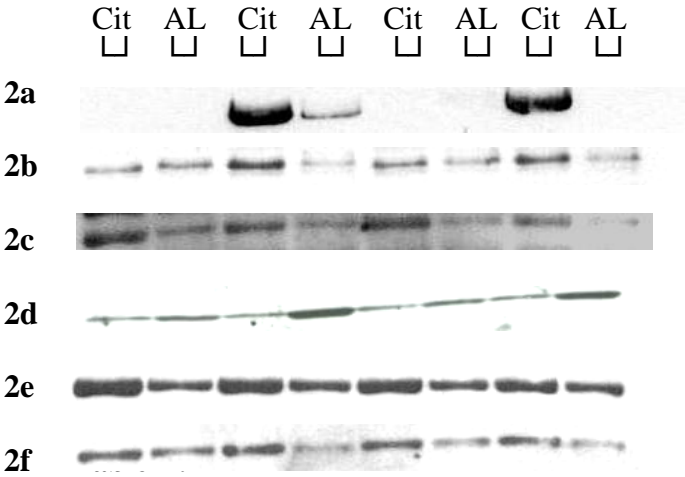


Table I:

Gel number	Cy5	Cy2	Cy3
1	IS	AL 1	R 3
2	IS	AL 2	NEAA 3
3	IS	R 1	AL 4
4	IS	R 2	CIT 3
5	IS	NEAA 1	CIT 4
6	IS	NEAA 2	R 4
7	IS	CIT 1	NEAA 4
8	IS	CIT 2	AL 3
11	Non labelled pool AL-NEAA		
12	Non labelled pool R-CIT		

Table II :

Identified protein	Spot	CIT/R		CIT/AL		EXPERIMENTAL		THEORETICAL	
		T-test	Fold change	T-test	Fold change	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
Myofibrillar proteins									
α -actin	51	1.6E-02	1.6	4.0E-02	1.8	28	4.9	42	5.2
	82	2.1E-02	1.5	2.9E-02	1.8	46	5.7	42	5.2
α -actinin-1	147	3.2E-01	1.1	1.1E-03	1.4	102	5.5	103	5.2
Myosin light chain 1	32	5.5E-02	1.2	2.8E-02	1.5	21	5.0	21	5.0
	18	1.2E-02	1.5	1.5E-02	1.6	13	4.5	21	5.0
Myosin regulatory light chain 2	21	9.9E-03	1.7	1.4E-03	2.2	17	4.7	19	4.8
	22	2.1E-02	2.0	5.0E-03	2.0	17	4.7	19	4.8
	23	1.1E-02	-2.5	7.2E-03	-2.5	17	4.8	19	4.8
Myosin light chain 3	17	7.9E-02	1.3	1.2E-02	1.5	13	4.5	17	4.6
	19	2.0E-04	1.3	2.2E-02	1.4	14	4.5	17	4.6
Myosin heavy chain 4	113	1.3E-01	1.2	1.6E-02	1.4	70	5.7	223	5.6
Cytoskeletal proteins									
Gelsolin	155	5.2E-03	-1.5	1.0E-02	-1.4	95	5.8	86	5.8
Profilin-2	11	1.2E-01	-1.1	1.4E-02	-1.4	12	6.1	15	6.6
Tubulin α -1B chain	101	4.0E-02	-1.3	7.0E-03	-1.6	63	5.1	50	4.9
Tubulin β -2C chain	96	2.8E-01	-1.2	3.4E-02	-1.5	61	5.0	50	4.8

Table III:

Identified protein	Spot	CIT/R		CIT/AL		EXPERIMENTAL		THEORETICAL	
		T-test	Fold change	T-test	Fold change	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
Glycogenolysis and glycolysis enzymes									
Glycogen phosphorylase. muscle form	157	1.3E-02	1.5	4.9E-03	1.8	98	5.9	97	6.9
	169	2.1E-03	1.5	9.2E-05	1.9	97	6.9	97	6.9
	172	7.5E-03	1.4	1.1E-03	1.8	98	6.6	97	6.9
	173	1.3E-02	1.3	8.2E-04	1.7	98	6.4	97	6.9
Phosphoglucomutase-1	114	3.1E-01	1.2	1.8E-02	1.7	70	5.7	61	6.3
	116	2.9E-01	1.3	2.9E-02	1.9	69	6.3	61	6.3
6-phosphofructokinase	161	3.1E-01	1.2	2.3E-02	1.4	90	6.0	86	8.2
Triosephosphate isomerase	39	8.2E-03	1.7	6.0E-02	1.9	24	6.5	27	6.9
	40	4.3E-03	1.2	2.8E-02	1.4	25	6.6	27	6.9
	41	3.7E-02	1.5	1.1E-01	1.6	24	6.8	27	6.9
	177	4.0E-03	1.6	7.9E-02	1.6	24	6.3	27	6.9
	178	2.8E-02	1.4	2.8E-01	1.3	25	6.3	27	6.9
Beta-enolase	124	7.5E-03	1.5	2.1E-02	1.7	52	6.9	47	7.1
	125	3.2E-04	1.3	1.0E-02	1.5	52	6.8	47	7.1
	127	1.4E-02	1.5	2.5E-02	1.6	52	6.7	47	7.1
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	132	1.1E-01	1.3	5.9E-03	1.5	64	6.9	58	6.6
Mitochondrial enzymes									
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	70	7.8E-01	-1.0	3.9E-02	-1.4	40	5.8	40	6.5
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	137	1.5E-01	-1.2	9.5E-03	-1.6	76	6.4	72	6.8
	138	3.9E-01	-1.1	3.8E-02	-1.4	76	6.4	72	6.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] Fe-S protein 3	37	5.8E-01	-1.1	3.8E-02	-1.5	25	5.9	30	7.1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2	120	9.6E-01	1.0	2.1E-02	-1.5	49	6.3	53	6.5
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	144	2.0E-01	-1.1	4.4E-02	-1.5	87	5.5	79	5.7

Table IV :

	AL	R	NEAA	CIT
Acetyl Co A deshydrogénase U ($\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$)	$56.2 \pm 18,1$	80.4 ± 38.1	75.5 ± 41.4	66.4 ± 21.0
Citrate synthase U ($\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$)	0.386 ± 0.038	0.319 ± 0.029	0.378 ± 0.030	0.262 ± 0.015
Cytochrome c oxydase U ($\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$)	4.037 ± 0.405	4.552 ± 0.165	4.770 ± 0.494	4.447 ± 0.161
Complexe I Arbitrary units	$10\,394 \pm 811$	$21\,640 \pm 1\,741$	$12\,081 \pm 745$	$18\,774^* \pm 2\,145$

Table V :

Identified protein	Spot	CIT/R		CIT/AL		EXPERIMENTAL		THEORICAL	
		T-test	Fold change	T-test	Fold change	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
Proteasome activator complex subunit 1	46	7.3E-02	-1.5	8.7E-03	-1.8	27	5.7	29	5.8
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	139	5.4E-02	-1.5	3.3E-02	-1.6	77	5.8	70	5.6

Table VI:

	AL	CIT
Acta	1462 ± 109	2086 ± 295
Actn1	0.044 ± 0.006	0.049 ± 0.008
Gsn	0.542 ± 0.247	1.524 ± 0.761
IDH3A	0.644 ± 0.159	0.878 ± 0.114
Myh4	40.644 ± 9.805	61.126 ± 12.175
Myl1	65.696 ± 17.317	90.514 ± 10.189
Pfkm	1.087 ± 0.258	1.190 ± 0.207
Pfn2	1.525 ± 0.143	$3.559 \pm 0.226^*$
Pygm	2.548 ± 0.835	5.383 ± 0.847

2. PARTIE CLINIQUE



« CIPROAGE »

Supplémentation en citrulline du sujet âgé dénutri hospitalisé : effets sur le métabolisme protéique.

Numéro promoteur : P070127

Accord du Comité de Protection des Personnes Ile de France XI (référence : 07068) en 2007

Responsable Scientifique : Dr. Christian Aussel

Hôpital Emile-ROUX, Service de Gériatrie 2, Dr Olivier Bouillanne

Hôpital Albert-CHENEVIER, Département hospitalo-universitaire de Médecine Interne et Gériatrie, Pr. Eléna Paillaud

Hôpital BICHAT-Claude-BERNARD, Service de Gériatrie, Dr Agathe Raynaud-Simon

Hôpital Raymond-POINCARE, Département de Médecine aiguë spécialisée, Pr Jean-Claude Melchior

Hôpital Charles-FOIX, Service de Gériatrie-L'Orbe Joseph Babinski, Dr Sylvie Meaume

9 patients inclus au 18 Octobre 2010

2.1. Résumé

La prévalence de la dénutrition-protéino-énergétique est considérable chez les personnes âgées hospitalisées. L'effet anabolique de la prise alimentaire est altéré chez le sujet âgé, ce qui conduit à un défaut de réponse à la renutrition. Ce phénomène pourrait être lié, en partie, à une utilisation excessive des acides aminés par l'aire splanchnique, ce qui entraîne une moindre disponibilité des acides aminés pour les tissus périphériques. Des travaux expérimentaux réalisés dans un modèle de dénutrition chez le rat âgé, ont montré que la citrulline était un puissant activateur de la synthèse protéique musculaire.

Notre hypothèse de travail est qu'il est possible, chez la personne âgée dénutrie, que la citrulline, en échappant à la séquestration splanchnique et de part ses propriétés pharmacologiques stimule l'anabolisme protéique musculaire. Ainsi, nous développons un essai prospectif, contrôlé, randomisé, multicentrique et en double aveugle, afin d'évaluer la synthèse protéique chez 30 sujets âgés hospitalisés modérément dénutris, après un régime de trois semaines apportant quotidiennement par voie orale 10 g de L-citrulline ou une quantité isoa-zotée d'un mélange d'AANE. Le flux de synthèse protéique corps entier à l'état post-absorptif est mesuré par la dilution isotopique de L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) exprimé en g/kg de masse maigre/24h. Nous évaluons aussi, au cours de cette étude, l'effet de la citrulline sur d'autres paramètres du *turn-over* protéique, à l'état post-absorptif et à l'état post-prandial.

2.2. Introduction

L'étude clinique CIPROAGE a bénéficié d'une subvention de la Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique d'Ile de France - Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, pour le PHRC (numéro promoteur : P070127) et obtenu l'accord du Comité de Protection des Personnes Ile de France XI (référence : 07068) en 2007 et de l'AFSSAPS le 15 Décembre 2009.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la synthèse protéique chez les sujets âgés dénutris hospitalisés, après un régime de trois semaines apportant quotidiennement, par voie orale, 10 g de L-Cit.

2.3. Méthodologie

Il s'agit d'un essai thérapeutique, prospectif, contrôlé, randomisé, multicentrique (Hôpitaux Emile-Roux, Charles-Foix, Raymond-Poincaré, Albert-Chenevier et Bichat-Claude Bernard) en double aveugle, comparatif sur deux groupes parallèles. La randomisation est réalisée par blocs de permutation de 4 ; comme l'essai est multicentrique, la randomisation est stratifiée par centre.

Il est prévu d'inclure 15 sujets par groupe, qui reçoivent selon le groupe auxquels ils appartiennent soit 10g de Cit/ jour pendant 21 jours, soit un mélange d'AANE en quantité isoazotée au régime Cit (alanine, aspartate, glycine, sérine, histidine, proline en quantité équimolaire) (figure 21).

Critères d'éligibilité :

- ***Critères d'inclusion*** : les sujets doivent être âgés de plus de 70 ans et hospitalisés en médecine gériatrique ou en soins de suite et réadaptation. Ils doivent présenter une dénutrition modérée récente ($30 \text{ g/l} < \text{albuminémie} \leq 35 \text{ g/l}$ ou $18 < \text{IMC} \leq 22$ ou un score du MNA < 17 avec albuminémie $> 30 \text{ g/l}$) et ingérer au moins 20 kcal/kg/j et $0,8 \text{ g/kg/j}$ de protéines,

- ***Critères de non-inclusion*** : durée d'hospitalisation programmée $< 21\text{j}$, CRP $> 50 \text{ mg/l}$, insuffisance cardiaque de stade IV, insuffisance digestive grave, insuffisance rénale (clairance créatinine $< 30 \text{ ml/mn}$), insuffisance respiratoire, Mini Mental Status < 18 , pathologie infectieuse aiguë ou chronique non contrôlée (VIH, tuberculose...), traitement par corticoïdes, néoplasies évolutives, phase palliative d'une pathologie grave, nécessité de recourir à une nutrition parentérale, hépatites chroniques actives ou cirrhose, participation à un autre essai.

Critères d'évaluation :

Le flux de synthèse protéique corps entier à l'état post-absorptif constitue le critère principal d'évaluation. Il est mesuré par la dilution isotopique de L-Leu ($1\text{-}^{13}\text{C}$) exprimé en g/kg de masse maigre/24h et par la mesure de l'air expiré et du $^{13}\text{CO}_2$ par calorimétrie.

Les paramètres de l'étude autre que la synthèse protéique, à l'état post-absorptif et à l'état post-prandial, sont la vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine, le poids, l'indice de masse corporelle, la composition corporelle (DEXA, impédancemétrie), l'activité physique, la tolérance

clinique, les mesures plasmatiques de transthyrétine, d'albumine, d'insuline, d'IGF₁, d'AAs et de la CRP.

Recueil des données :

La composition corporelle est mesurée par DEXA et impédancemétrie au J1 et au J20. Au J1 et J21, des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la créatininémie, glycémie, CRP, albuminémie, transthyrétinémie, IGF₁, insulínémie et AAs.

La tolérance clinique est évaluée tous les jours et il en est de même pour l'activité physique qui est mesurée grâce à un podomètre.

Des séries de recueil des ingesta sont réalisés sur trois jours, au début (J1, J2, J3), au milieu (J12, J13, J14) et à la fin (J18, J19, J20) de l'étude.

Le 21^{ème} jour de l'étude le sujet à jeun depuis la veille 22h, est transféré au centre d'investigation clinique de l'Hôpital Henri-Mondor (Créteil) pour la réalisation de l'étude métabolique. La synthèse protéique est alors mesurée à l'état post-absorptif et post-prandial.

Le protocole de l'étude est détaillé en annexe.

2.4. Etat des lieux

Dans le cadre de cette étude clinique, différentes missions m'ont été confiées :

- Le développement galénique des préparations d'AAs en collaboration avec la Pharmacie à Usage Interne d'Henri Mondor ;
- En collaboration avec l'Attaché de Recherche Clinique en charge de l'étude, nous avons rédigé les cahiers d'observations et les différentes procédures concernant le circuit des échantillons biologiques, du médicament et du transport des sujets entre les différents centres d'inclusion et le Centre d'Investigation Clinique ;
- Participation à l'ouverture des centres en présentant aux personnels médicaux et soignants, le protocole clinique et l'ensemble des procédures ;
- Aide dans les différents centres d'inclusion à la sélection des sujets potentiellement éligibles pour participer à ce protocole ;
- Aide opérationnelle à la mise en place de l'étude du turn-over protéique au Centre d'Investigation Clinique d'Henri Mondor ;

Cette étude a pris du retard pour des raisons d'autorisation administrative. En effet, la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) de l'hôpital Henri Mondor était chargée de délivrer les AAs aux centres investigateurs et les isotopes stables au Centre d'Investigation Clinique. Pour cela, la PUI a, dans un premier temps, vérifié la conformité des produits livrés, par une société non pharmaceutique, à la Pharmacopée Européenne. Cette étape a été longue et nécessitée de nombreux échanges entre la PUI et l'AFSSAPS, et notamment pour certifier l'innocuité des isotopes stables administrés par voie intra-veineuse. Dans un deuxième temps, les formes galéniques ont été développées, préparées, puis contrôlées. Ce contrôle nécessite notamment des essais de traçabilité dans le temps, à différentes températures, pour valider les délais de

conservation. Ces essais sont particulièrement longs. Au terme de ces contrôles, l'AFSSAPS a donné l'autorisation administrative d'ouvrir les centres d'inclusion à partir du 15 Décembre 2009. L'étude prévoit d'inclure 30 patients sur 2 ans et, au 21 Octobre 2010, 9 patients sont inclus dans l'étude.

La Direction de la Recherche Clinique et du Développement de l'APHP, promoteur de l'étude ne nous a pas donné l'autorisation de communiquer les premiers résultats.

DISCUSSION GENERALE

La Cit est un nouvel élément important de l'homéostasie musculaire car elle permet une amélioration de la disponibilité périphérique en azote (Moinard & Cynober, 2007) et stimule l'anabolisme protéique au niveau du muscle âgé (Osowska *et al.*, 2006). Parmi les autres AAs, seule la Leu a un tel effet. Bien que la Cit soit capable de stimuler la synthèse protéique, son effet sur les capacités fonctionnelles du muscle et son mode d'action restent encore à définir.

Nos travaux ont permis de montrer qu'une complémentation à court terme en Cit (sur une semaine) chez des rats âgés dénutris augmente la masse musculaire et l'activité motrice, paramètres corrélés à une augmentation de la force musculaire. Elle augmente aussi considérablement l'expression de certaines protéines myofibrillaires, qui jouent un rôle important dans les capacités contractiles du muscle, ce qui pourrait expliquer l'amélioration des capacités fonctionnelles musculaires mise en évidence suite à un apport en Cit. De plus, il semblerait qu'au-delà d'une stimulation de la protéosynthèse, la Cit intervienne également au niveau de la protéolyse. Cependant, ces observations doivent être confirmées et soulignent le fait que les voies de régulation de la synthèse et de la dégradation protéique sont intimement liées. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent également que la Cit réorienterait le métabolisme énergétique musculaire avec un *shift* vers un métabolisme essentiellement anaérobique.

Sur le plan fonctionnel, nous avons observé chez les rats âgés dénutris puis renourris avec de la Cit pendant une semaine, une amélioration de l'activité motrice, rejoignant le niveau observé chez de jeunes rats en bonne santé (Moinard *et al.*, 2004). L'alternance spontanée des rats n'étant pas modifiée selon les régimes ; nous en avons conclu que l'augmentation de l'activité motrice retrouvée chez les rats du groupe Cit n'est pas due à des modifications de l'attention, la peur ou l'anxiété (Moinard *et al.*, 2004). Les valeurs d'alternance spontanée

obtenues sont proches des références que nous avons pour de jeunes rats (Moinard *et al.*, 2004), montrant que le comportement d'exploration n'est pas affecté par le vieillissement. Ainsi, l'augmentation de l'activité motrice observée chez les rats complémentés en Cit résulterait essentiellement d'une amélioration des fonctions musculaires.

Une étude récente réalisée au laboratoire chez des rats âgés sains (ayant reçu 5 g/kg/j pendant 5 j) a permis de montrer que la Cit augmentait la motricité de ces animaux. Des résultats préliminaires suggèrent que cet effet pourrait être lié à une activation de la voie dopaminergique (Tliba L *et al.*, 2010 ; données non publiées). La Cit pourrait donc aussi avoir une action centrale.

De plus, nous avons montré des corrélations positives entre les augmentations de masse, du contenu protéique et de la force musculaires, suite à l'apport en Cit. Dans la littérature (Harris, 1997; Clark & Manini, 2008), la corrélation entre masse et force musculaires est sujette à controverse. Les premières études réalisées sur ce sujet avaient établi que la masse musculaire était un déterminant majeur des modifications de force musculaire maximale chez les personnes âgées, en mettant en avant une relation linéaire entre ces deux paramètres (Frontera *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 2003). Cependant, d'autres études plus récentes n'ont pas retrouvé cette association (Goodpaster *et al.*, 2006; Beliaeff *et al.*, 2008; Rolland & Vellas, 2009). En effet, d'autres paramètres, tels que des facteurs neurologiques ou d'autres facteurs musculaires contribuent aux modifications de la force musculaire, indépendamment des changements de masse musculaire (Clark & Manini, 2008; Rolland & Vellas, 2009). Il est également intéressant de souligner qu'une amélioration de la force musculaire entraîne une amélioration des capacités fonctionnelles du muscle, alors qu'une augmentation de la masse musculaire sans augmentation de force ne permet pas cette amélioration fonctionnelle (Rolland & Vellas, 2009). Dans notre étude, l'augmentation de la masse musculaire est associée aussi bien à

l'augmentation de l'activité motrice qu'à celle de la force maximale isométrique, suggérant ainsi que la Cit serait capable d'améliorer les capacités fonctionnelles du muscle. L'administration chronique de Leu a des effets bénéfiques sur la synthèse protéique musculaire des personnes âgées, mais n'entraîne aucune amélioration de la masse ni la force musculaire (Verhoeven *et al.*, 2009). En revanche, des travaux de notre laboratoire (données non publiées), réalisés chez le rat âgé sain, montrent qu'un apport chronique en Cit augmente la masse musculaire.

L'hypothèse selon laquelle la Cit améliorerait les capacités fonctionnelles musculaires peut être appuyée par les autres résultats que nous avons obtenus : nous avons montré que la Cit entraîne une surexpression des principaux constituants myofibrillaires. L'analyse de protéomique différentielle réalisée sur les extraits protéiques de tibialis de ces mêmes rats a mis en évidence une surexpression significative de l' α -actine, de l' α -actinine, des chaînes légères de myosine 1 et 3, régulatrices 2 et des chaînes lourdes 4, suite à l'administration de Cit. Plusieurs études (Nair, 1995; Balagopal *et al.*, 1997a; Piec *et al.*, 2005; Donoghue *et al.*, 2010) ayant analysé l'effet de l'âge sur le protéome du muscle squelettique chez le rat ont trouvé d'importantes modifications au niveau de l'expression de protéines contractiles (actine et myosine) ; celles-ci seraient majoritairement responsables du déclin de la force musculaire chez le rat âgé. De même, chez les personnes âgées, la synthèse des chaînes lourdes de myosine décline avec l'âge (Balagopal *et al.*, 1994), ce qui contribue largement au déclin de masse et des fonctions contractiles musculaires (Balagopal *et al.*, 1997a; D'Antona *et al.*, 2003). Chez le rat âgé, la Leu n'a aucun effet stimulateur spécifique de la synthèse des chaînes lourdes de myosine (Guillet *et al.*, 2004). Les résultats de notre étude suggèrent fortement que la Cit est capable d'augmenter l'expression de protéines myofibrillaires à un niveau suffisant pour améliorer les fonctions contractiles et la masse musculaires.

Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la gelsoline (facteur dépolymérisant des filaments d'actine) (Piec *et al.*, 2005) et de la tubuline cytosquelettiques (Piec *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2009) a été observée au niveau du muscle squelettique de rats âgés. Piec *et al.* (2005) posent l'hypothèse que cette surexpression compenserait les perturbations des structures myofibrillaires, afin de protéger les fibres musculaires. Dans notre étude, puisque la Cit augmente l'expression des constituants myofibrillaires, la surexpression des constituants du cytosquelette n'est plus nécessaire à la protection des fibres musculaires. D'ailleurs, l'expression de la gelsoline, de la profiline-2 et des chaînes α -1B et β -2C de la tubuline diminue chez les rats sous Cit. Il est par ailleurs intéressant de noter que ces effets sont propres à la Cit, puisque nous n'avons pas retrouvé de tel effet pour la Leu.

La surexpression des protéines myofibrillaires et la diminution des protéines cytosquelettiques expliqueraient en partie l'amélioration de la masse et de la fonctionnalité musculaires des rats âgés renourris avec de la Cit. De plus, la Cit diminue l'expression d'éléments intervenant dans la dégradation protéique (i.e. protéolyse et oxydation), ce qui participe aussi à l'atténuation du déclin musculaire. En effet, nous avons montré une moindre expression de la sous-unité 1 du complexe activateur du protéasome chez les rats complémentés en Cit. La plupart des études concernant la Cit sur le métabolisme protéique est basée sur sa capacité à stimuler la synthèse protéique musculaire (Osowska *et al.*, 2006). Les seules données disponibles *in vivo* (évaluées par l'excrétion de 3-MH) ou *in vitro* (par les flux de tyrosine) évaluant l'effet de la Cit sur la protéolyse n'avaient pas permis de mettre de différence en évidence chez le rat âgé dénutri (Osowska *et al.*, 2006). Cependant, il est à noter que ces paramètres sont très généraux et ne permettent pas de définir une quelconque action mécanistique. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence pour la première fois que la

Cit pourrait aussi agir sur le métabolisme protéique par le biais d'une inhibition de la protéolyse, en modulant l'expression de ce complexe activateur du protéasome. Cependant, ces résultats doivent être confirmés par des données complémentaires, évaluant plus spécifiquement l'action de la Cit sur le protéasome. Les personnes âgées présentent une protéolyse légèrement plus élevée à jeun que les sujets jeunes (Volpi *et al.*, 2001) et la voie ubiquitine-protéasome dépendante semble être la principale responsable de la dégradation des protéines du muscle squelettique (Smith *et al.*, 2005). La Cit, en inhibant l'expression de la sous-unité 1 du complexe activateur du protéasome pourrait ainsi réduire l'augmentation de la protéolyse retrouvée chez les personnes âgées. Parmi les autres stratégies nutritionnelles testées dans ce contexte, seul un apport en Leu à court terme (5% du repas) permet une réduction des activités du protéasome survenant avec l'âge (Combaret *et al.*, 2005).

Le complexe protéique mTOR, qui est activé par la Cit afin de stimuler la synthèse protéique musculaire (Moinard *et al.*, 2007b), est également impliqué dans l'inhibition de l'atrophie musculaire (Glass, 2005). En effet, mTOR bloque l'activation des facteurs de transcription MuRF1 et MAFbx qui codent pour des éléments impliqués dans la voie ubiquitine-protéasome dépendante (Bodine *et al.*, 2001). Une des hypothèses que nous pouvons proposer serait que la Cit induit une inhibition de MuRF1 et MAFbx par le biais de l'activation de mTOR ; ceci pourrait expliquer la diminution de l'expression de la sous-unité 1 du complexe activateur du protéasome par la Cit.

Il a de plus été montré que les chaînes lourdes de la myosine étaient essentiellement dégradées par la voie ubiquitine-protéasome dépendante (Schulze *et al.*, 2005). La diminution de l'expression du complexe activateur du protéasome par la Cit pourrait ainsi limiter la dégradation des chaînes lourdes de myosine. Ce pourrait être une explication à la surexpression des chaînes lourdes de myosine retrouvée chez les rats complémentés en Cit.

La Cit pourrait également participer à l'atténuation du déclin musculaire des rats âgés grâce à ses propriétés anti-oxydantes (Akashi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010). En effet, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine heat shock 70 kDa (hsp70) au niveau du tibialis, chez les rats ayant reçu de la Cit. L'expression de cette protéine est largement augmentée au niveau du muscle squelettique de rats âgés (Piec *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2007). Cette hsp est surexprimée dans les situations de stress (i.e., infection, inflammation, privation de nourriture...) afin de protéger les cellules et les organes (Lee *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2010). La Cit est connue pour ses propriétés anti-oxydantes (Akashi *et al.*, 2001). Ainsi, la réduction du stress oxydant expliquerait la moindre expression de hsp70. Il est établi que le stress oxydant est en partie responsable du déclin musculaire observé au cours du vieillissement (Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010) ; la diminution de l'expression de hsp70 induite par la Cit pourrait ainsi participer à l'atténuation du déclin musculaire. De plus, l'augmentation de l'activité du site catalytique du complexe 1 est souvent observée lorsqu'on améliore le statut redox d'une cellule, en diminuant la production de ROS (reactive oxygen species) et/ou en augmentant la protection antioxydante (données non publiées). Au cours de notre étude, nous avons montré que l'activité catalytique du complexe I est augmentée chez les rats complémentés en Cit. Ces données sont en accord avec les observations précédentes sur les propriétés antioxydantes de la Cit car, dans le même modèle de malnutrition protéino-énergétique, la Cit permet de réduire de façon drastique la carbonylation des protéines musculaires (Moinard 2007, brevet).

Ainsi, la Cit agirait au niveau du muscle squelettique du rat âgé en favorisant l'expression des protéines myofibrillaires et en réduisant leur dégradation, ce qui entraîne une amélioration de

la trophicité et des capacités fonctionnelles musculaires. Le lien entre masse protéique et métabolisme énergétique est bien établi et nos résultats suggèrent une action modulatrice de la Cit sur le métabolisme énergétique musculaire : nous avons mis en évidence des modifications de l'expression d'enzymes intervenant dans le métabolisme énergétique (i.e., glucidique et mitochondrial) suite à l'apport en Cit. Cet effet n'a pas été retrouvé pour la Leu (données non publiées).

Nous avons montré, chez les rats complémentés en Cit, une surexpression de certaines enzymes impliquées dans la glycogénolyse et la glycolyse. A l'inverse, les enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale étaient globalement sous-exprimées suite à l'apport en Cit chez ces rats âgés dénutris. Les données de la littérature montrent, dans le muscle squelettique âgé, une diminution de l'expression de la glycogène phosphorylase (Gelfi *et al.*, 2006), de la phosphoglucomutase, de la triose phosphate isomérase, de la β -énolase (Gelfi *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*, 2009) et de la pyruvate kinase (Piec *et al.*, 2005; Capitanio *et al.*, 2009). En ce qui concerne les effets du vieillissement sur le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale, les données sont davantage controversées. En effet, certaines études ont montré que les protéines impliquées dans le métabolisme oxydatif étaient plus abondantes chez les personnes âgées que chez les jeunes (Gelfi *et al.*, 2006; Capitanio *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010), alors que d'autres parlent d'une dépression du métabolisme mitochondrial dans le muscle squelettique âgé (Piec *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2009).

Cette réorientation du métabolisme énergétique induite par la Cit peut être mise en relation avec son effet sur la composition corporelle. En effet, nous avons précédemment montré qu'un apport en Cit pendant 3 mois modifiait de manière importante la composition corporelle de rats âgés. Cette complémentation prolongée en Cit augmentait considérablement la masse et le

contenu protéique des muscles glycolytiques des rats âgés alors que les masses grasses sous-cutanée et intra-abdominale étaient diminuées (Moinard *et al.*, 2009). Au cours d'une autre étude, il a été montré que l'administration de jus de pastèque (riche en Cit) limitait l'accumulation graisseuse chez des rats diabétiques obèses (Wu *et al.*, 2007). Il est dorénavant bien établi que le métabolisme énergétique et le type musculaire sont interdépendants. Compte-tenu de l'ensemble de ces données, nos résultats sur les modifications des expressions enzymatiques induites par la Cit suggèrent fortement que la Cit modifie le métabolisme énergétique : il semblerait que la Cit réoriente le métabolisme du *tibialis* vers un mode de fonctionnement essentiellement anaérobique.

De plus, les modifications d'expressions protéiques mises en évidence sous Cit résulteraient d'un effet au niveau traductionnel et/ou post-traductionnel ; en effet, les résultats de RT-PCR obtenus ne montrent aucun effet de la Cit au niveau de la transcription. Ceci est en accord avec les données de la littérature, la Cit étant connue pour son effet sur la stimulation de la synthèse protéique (Osowska *et al.*, 2006; Moinard *et al.*, 2007a; Moinard *et al.*, 2007b).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons montré pour la première fois que la Cit permettrait d'améliorer la fonction musculaire chez des rats âgés dénutris. Cet effet bénéfique de la Cit sur les capacités musculaires résulterait, au moins en partie, d'une surexpression des protéines contractiles myofibrillaires et d'une diminution de l'expression d'éléments impliqués dans des voies de dégradation protéique. Son mécanisme d'action reste encore à préciser, bien que nos données suggèrent une réorientation du métabolisme énergétique avec un *shift* vers un mode de fonctionnement essentiellement anaérobie. Il est possible que le dénominateur commun de ces différents effets soit l'action anti-oxydante puissante de la Cit.

En complément de ces données expérimentales, nous développons une étude clinique afin de vérifier les effets bénéfiques de la Cit sur le métabolisme protéique, chez la personne âgée dénutrie. Les résultats de cette étude seront essentiels pour élaborer un essai thérapeutique chez un grand nombre de sujets âgés dénutris afin de démontrer l'efficacité de la Cit sur des paramètres reflétant la fonction musculaire.

Ainsi, la Cit pourrait être une stratégie nutritionnelle efficace et innovante afin de prévenir et de traiter la sarcopénie et la dynapénie. Elle pourrait retarder l'entrée dans la dépendance, améliorer la qualité de vie et limiter la morbi-mortalité liée à la dénutrition protéino-énergétique des personnes âgées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akashi K, Miyake C & Yokota A (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett* 508, 438-442.
- Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS & Kimball SR (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* 130, 2413-2419.
- Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, *et al.* (1999) Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *Am J Clin Nutr* 69, 1202-1208.
- Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, *et al.* (2000a) Protein turnover modifications induced by the protein feeding pattern still persist after the end of the diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E902-E909.
- Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, *et al.* (2000b) Protein feeding pattern does not affect protein retention in young women. *J Nutr* 130, 1700-1704.
- Arnal MA, Mosoni L, Dardevet D, Ribeyre MC, Bayle G, Prugnaud J & Patureau MP (2002) Pulse protein feeding pattern restores stimulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats. *J Nutr* 132, 1002-1008.
- Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP & Grizard J (2005) Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1962-1973.
- Baier S, Johannsen D, Abumrad N, Rathmacher JA, Nissen S & Flakoll P (2009) Year-long changes in protein metabolism in elderly men and women supplemented with a nutrition cocktail of β -hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), L-arginine, and L-lysine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 33, 71-82.
- Balagopal P, Nair KS & Stirewalt WS (1994) Isolation of myosin heavy chain from small skeletal muscle samples by preparative continuous elution gel electrophoresis: application to measurement of synthesis rate in human and animal tissue. *Anal Biochem* 221, 72-77.
- Balagopal P, Ljungqvist O & Nair KS (1997a) Skeletal muscle myosin heavy-chain synthesis rate in healthy humans. *Am J Physiol* 272, E45-E50.
- Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS (1997b) Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol* 273, E790-E800.
- Beaufrère B (1994) Métabolisme des protéines. In Bresson J-L, Enseignement de la nutrition, Tome I Physiologie, pp. 95-120
- Beaufrère B & Morio B (2000) Fat and protein redistribution with aging: metabolic considerations. *Eur J Clin Nutr* 54, S48-S53.

- Beaufrère B (2002) Métabolisme des acides aminés chez l'homme normal. In Selam J-L, Journées de diabétologie de l'Hôtel-Dieu, Paris: Flammarion Médecine-Sciences, pp. 93-103.
- Beliaeff S, Bouchard DR, Hautier C, Brochu M & Dionne IJ (2008) Association between muscle mass and isometric muscle strength in well-functioning older men and women. *J Aging Phys Act* 16, 484-493.
- Bendahan D, Mattei JP, Ghattas B, Confort-Gouny S, Le Guern ME & Cozzone PJ (2002) Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *Br J Sports Med* 36, 282-289.
- Beugnet A, Tee AR, Taylor PM & Proud CG (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem J* 372, 555-566.
- Biolo G & Wolfe RR (1993) Insulin action on protein metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 7, 989-1005.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, *et al.* (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704-1708.
- Boirie Y, Gachon P & Beaufrere B (1997) Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 65, 489-495.
- Boirie Y, Gachon P, Cordat N, Ritz P & Beaufrere B (2001a) Differential insulin sensitivities of glucose, amino acid, and albumin metabolism in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 638-644.
- Boirie Y, Short KR, Ahlman B, Charlton M & Nair KS (2001b) Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes* 50, 2652-2658.
- Boirie Y, Guillet C, Zangarelli A, Gryson C & Walrand S (2005) Deterioration of protein metabolism during ageing. *Nutr Clin Métabol* 19, 138-142.
- Bonnefoy M, Cornu C, Normand S, Boutitie F, Bugnard F, Rahmani A, Lacour JR & Laville M (2003) The effects of exercise and protein-energy supplements on body composition and muscle function in frail elderly individuals: a long-term controlled randomised study. *Br J Nutr* 89, 731-739.
- Borsheim E, Aarsland A & Wolfe RR (2004) Effect of an amino acid, protein, and carbohydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14, 255-271.
- Bos C, Benamouzig R, Bruhat A, Roux C, Mahe S, Valensi P, Gaudichon C, Ferriere F, Rautureau J & Tome D (2000) Short-term protein and energy supplementation activates

- nitrogen kinetics and accretion in poorly nourished elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 71, 1129-1137.
- Bouillanne O, Hamont-Vilcot B, Curis E, Nicolis I, Chrétien P, Schauer N, Coulombel I, Vincent JP, Cynober L & Aussel C (2009) Augmentation de la masse maigre chez des sujets âgés hospitalisés par un régime protéique pulsé. Etude prospective randomisée. *Nutr Clin Metabol* 23, S27-S28 (résumé).
- Brooks N, Cloutier GJ, Cadena SM, Layne JE, Nelsen CA, Freed AM, Roubenoff R & Castaneda-Sceppa C (2008) Resistance training and timed essential amino acids protect against the loss of muscle mass and strength during 28 days of bed rest and energy deficit. *J Appl Physiol* 105, 241-248.
- Butler-Browne G & Bigard A (2006) Muscle ageing and preventive effects of regular exercise. *Sci Sports* 21, 184-193.
- Campbell WW, Crim MC, Young VR, Joseph LJ & Evans WJ (1995) Effects of resistance training and dietary protein intake on protein metabolism in older adults. *Am J Physiol* 268, E1143-E1153.
- Campbell WW, Trappe TA, Wolfe RR & Evans WJ (2001) The recommended dietary allowance for protein may not be adequate for older people to maintain skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, M373-M380.
- Campbell WW & Leidy HJ (2007) Dietary protein and resistance training effects on muscle and body composition in older persons. *J Am Coll Nutr* 26, 696S-703S.
- Capel F, Prod'homme M, Bechet D, Taillandier D, Balage M, Attaix D & Combaret L (2009) Lysosomal and proteasome-dependent proteolysis are differentially regulated by insulin and/or amino acids following feeding in young, mature and old rats. *J Nutr Biochem* 20, 570-576.
- Capitanio D, Vasso M, Fania C, Moriggi M, Vigano A, Procacci P, Magnaghi V & Gelfi C (2009) Comparative proteomic profile of rat sciatic nerve and gastrocnemius muscle tissues in ageing by 2-D DIGE. *Proteomics* 9, 2004-2020.
- Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Farges MC, Pernet P, Cezard J, Raul F, Cynober L & Vasson MP (1999) Severe dietary restriction initiated in aged rats: evidence for poor adaptation in terms of protein metabolism and intestinal functions. *Eur J Clin Invest* 29, 504-511.
- Clark BC & Manini TM (2008) Sarcopenia \neq dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 829-834.
- Cohn SH, Vartsky D, Yasumura S, Sawitsky A, Zanzi I, Vaswani A & Ellis KJ (1980) Compartmental body composition based on total-body nitrogen, potassium, and calcium. *Am J Physiol* 239, E524-E530.

- Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D (2005) A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* 569, 489-499.
- Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L & Attaix D (2009) Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 37-41.
- Copeland KC, Colletti RB, Devlin JT & McAuliffe TL (1990) The relationship between insulin-like growth factor-I, adiposity, and aging. *Metabolism* 39, 584-587.
- Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L & Messing B (2000) Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 119, 1496-1505.
- Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C & Messing B (2003) Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* 124, 1210-1219.
- Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S & Cynober L (2005) Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 29, 177-205.
- Cynober L & Marcollet M (1994) Métabolisme des protéines. *Encycl. Med. Chir.*, 10-375-A10 — 12 pages.
- Cynober L, Le Boucher J & Vasson MP (1995) Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 6, 402-413.
- Cynober L, Alix E, Arnaud-Battandier F, Bonnefoy M, Brocker P & Cals MJ (2001) Les personnes âgées. In Martin A: Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Cachan: Lavoisier, pp. 307-335.
- D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B & Bottinelli R (2003) The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 552, 499-511.
- Dangin M, Boirie Y, Guillet C & Beaufrere B (2002) Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *J Nutr* 132, 3228S-3233S.
- Dangin M, Guillet C, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Bouteloup-Demange C, Reiffers-Magnani K, Fauquant J, Ballevre O & Beaufrere B (2003) The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *J Physiol* 549, 635-644.
- Dardevet D, Sornet C, Attaix D, Baracos VE & Grizard J (1994) Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. *Endocrinology* 134, 1475-1484.

- Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D & Grizard J (1995) Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J Clin Invest* 96, 2113-2119.
- Dardevet D, Sornet C, Balage M & Grizard J (2000) Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr* 130, 2630-2635.
- Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C & Grizard J (2002) Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr* 132, 95-100.
- De Bandt JP & Cynober LA (1998) Amino acids with anabolic properties. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1, 263-272.
- Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, *et al.* (2009) Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr* 90, 1579-1585.
- Denis C & Chatard J (1994) Adaptabilité du sujet âgé à l'entraînement à l'exercice d'endurance. *Sci Sports* 9, 209-213.
- Deutz NE (2008) The 2007 ESPEN Sir David Cuthbertson Lecture: amino acids between and within organs. The glutamate-glutamine-citrulline-arginine pathway. *Clin Nutr* 27, 321-327.
- Donoghue P, Staunton L, Mullen E, Manning G & Ohlendieck K (2010) DIGE analysis of rat skeletal muscle proteins using nonionic detergent phase extraction of young adult versus aged gastrocnemius tissue. *J Proteomics* 73, 1441-53.
- Drummond MJ & Rasmussen BB (2008) Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11, 222-226.
- Du M, Shen QW, Zhu MJ & Ford SP (2007) Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J Anim Sci* 85, 919-927.
- Elwyn DH, Parikh HC & Shoemaker WC (1968) Amino acid movements between gut, liver, and periphery in unanesthetized dogs. *Am J Physiol* 215, 1260-1275.
- Felgines C, Savanovitch C, Farges MC, Cynober L & Vasson MP (1999) Protein metabolism in rats during long-term dietary restriction: influence of aging. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23, 32-37.
- Fleury P & Eberhard R (1951) Determination of proteins by photometric, biuret method, according to the technique of Gornall. *Ann Biol Clin (Paris)* 9, 453-466.

- Forbes GB & Reina JC (1970) Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism* 19, 653-663.
- Frénét M & Vierling E (2002) Les fibres alimentaires. In Leyral G, *Biochimie des aliments - Diététique du sujet bien portant*, Paris : Doin, pp. 75-78.
- Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG & Evans WJ (1988) Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol* 64, 1038-1044.
- Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP & Evans WJ (1990) Strength training and determinants of VO₂max in older men. *J Appl Physiol* 68, 329-333.
- Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ & Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 71, 644-650.
- Fujita S & Volpi E (2006) Amino acids and muscle loss with aging. *J Nutr* 136, 277S-280S.
- Fujita S, Dreyer HC, Drummond MJ, Glynn EL, Cadenas JG, Yoshizawa F, Volpi E & Rasmussen BB (2007) Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis. *J Physiol* 582, 813-823.
- Fujita S, Glynn EL, Timmerman KL, Rasmussen BB & Volpi E (2009) Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia* 52, 1889-1898.
- Fukagawa NK, Minaker KL, Rowe JW, Goodman MN, Matthews DE, Bier DM & Young VR (1985) Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown. Dose-response effects on leucine metabolism in postabsorptive men. *J Clin Invest* 76, 2306-2311.
- Funai K, Parkington JD, Carambula S & Fielding RA (2006) Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTor signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R1080-R1086.
- Gallagher D, Ruts E, Visser M, Heshka S, Baumgartner RN, Wang J, Pierson RN, Pi-Sunyer FX & Heymsfield SB (2000) Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E366-E375.
- Gelfand RA & Barrett EJ (1987) Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J Clin Invest* 80, 1-6.
- Gelfi C, Vigano A, Ripamonti M, Pontoglio A, Begum S, Pellegrino MA, Grassi B, Bottinelli R, Wait R & Cerretelli P (2006) The human muscle proteome in aging. *J Proteome Res* 5, 1344-1353.

- Giner M, Laviano A, Meguid MM & Gleason JR (1996) In 1995 a correlation between malnutrition and poor outcome in critically ill patients still exists. *Nutrition* 12, 23-29.
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1974-1984.
- Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, Timmerman KL, Dhanani S, Volpi E & Rasmussen BB (2010) Excess Leucine Intake Enhances Muscle Anabolic Signaling but Not Net Protein Anabolism in Young Men and Women. *J Nutr* 140, 1970-1976.
- Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M & Newman AB (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 1059-1064.
- Greenlund LJ & Nair KS (2003) Sarcopenia, consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev* 124, 287-299.
- Grizard J, Dardevet D, Savarry I, Mosoni L, Meynial-Denis D, Arnal M & Patureau MP (2001) Implication de l'insuline et des glucocorticoïdes dans la fonte protéique musculaire chez le rat au cours du vieillissement. *Age Nutr* 12, 182-188.
- Guillet C, Prod'homme M, Balage M, Gachon P, Giraudet C, Morin L, Grizard J & Boirie Y (2004a) Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J* 18, 1586-1587.
- Guillet C, Zangarelli A, Mishellany A, Rousset P, Sornet C, Dardevet D & Boirie Y (2004b) Mitochondrial and sarcoplasmic proteins, but not myosin heavy chain, are sensitive to leucine supplementation in old rat skeletal muscle. *Exp Gerontol* 39, 745-751.
- Harris T (1997) Muscle mass and strength: relation to function in population studies. *J Nutr* 127(5), 1004S-1006S.
- Hartman WJ, Torre PM & Prior RL (1994) Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. *J Nutr* 124, 1950-1960.
- HAS (2007) Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/denutrition_personne_agee_2007_-_argumentaire.pdf.
- Hébuterne X, Schneider S, Peroux JL & Rampal P (1997) Effects of refeeding by cyclic enteral nutrition on body composition: comparative study of elderly and younger patients. *Clin Nutr* 16, 283-289.

- Hébuterne X & Schneider S (2000) Screening and prognostic value of malnutrition in the hospital setting. *Ann Med Interne (Paris)* 151, 557-562.
- Hébuterne X, Bermon S & Schneider SM (2001) Ageing and muscle: the effects of malnutrition, re-nutrition, and physical exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4, 295-300.
- Hikida RS, Staron RS, Hagerman FC, Walsh S, Kaiser E, Shell S & Hervey S (2000) Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. II. Muscle fiber characteristics and nucleo-cytoplasmic relationships. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B347-B354.
- Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R & Fiatarone Singh MA (2001) Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, B209-B217.
- Hurley BF (1995) Age, gender, and muscular strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50 Spec No, 41-44.
- Iglay HB, Thyfault JP, Apolzan JW & Campbell WW (2007) Resistance training and dietary protein: effects on glucose tolerance and contents of skeletal muscle insulin signaling proteins in older persons. *Am J Clin Nutr* 85, 1005-1013.
- Iglay HB, Apolzan JW, Gerrard DE, Eash JK, Anderson JC & Campbell WW (2009) Moderately increased protein intake predominately from egg sources does not influence whole body, regional, or muscle composition responses to resistance training in older people. *J Nutr Health Aging* 13, 108-114.
- INSEE (2005) Projection de population 2005-2050.
http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=ip1089®_id=0.
- Izquierdo M, Ibanez J, Gorostiaga E, Garrues M, Zuniga A, Anton A, Larrion JL & Hakkinen K (1999) Maximal strength and power characteristics in isometric and dynamic actions of the upper and lower extremities in middle-aged and older men. *Acta Physiol Scand* 167, 57-68.
- Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, Fangnan L, Li T, Nan L & Jieshou L (2005) Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J Surg Res* 127, 177-182.
- Jourdan M, Nair KS, Ford C, Shimke J, Ali B, Will B, Marc J, Aussel C & Cynober L (2008) Citrulline stimulates muscle protein synthesis at the post-absorptive state in healthy subjects fed a low protein diet. *Clin Nutr* 3, 11-12.
- Kagansky N, Berner Y, Koren-Morag N, Perelman L, Knobler H & Levy S (2005) Poor nutritional habits are predictors of poor outcome in very old hospitalized patients. *Am J Clin Nutr* 82, 784-791.

- Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR (2005) Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am J Clin Nutr* 82, 1065-1073.
- Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR (2006) A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E381-E387.
- Kent-Braun JA, Ng AV & Young K (2000) Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. *J Appl Physiol* 88, 662-668.
- Kikafunda JK & Lukwago FB (2005) Nutritional status and functional ability of the elderly aged 60 to 90 years in the Mpigi district of central Uganda. *Nutrition* 21, 59-66.
- Kim JS, Wilson JM & Lee SR (2010) Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. *J Nutr Biochem* 21, 1-13.
- Kimball SR & Jefferson LS (2006) New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr* 83, 500S-507S.
- Koopman R, Verdijk L, Manders RJ, Gijsen AP, Gorselink M, Pijpers E, Wagenmakers AJ & van Loon LJ (2006) Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. *Am J Clin Nutr* 84, 623-632.
- Koopman R, Beelen M, Stellingwerff T, Pennings B, Saris WH, Kies AK, Kuipers H & van Loon LJ (2007) Coingestion of carbohydrate with protein does not further augment postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E833-E842.
- Koopman R, Verdijk LB, Beelen M, Gorselink M, Kruseman AN, Wagenmakers AJ, Kuipers H & van Loon LJ (2008) Co-ingestion of leucine with protein does not further augment post-exercise muscle protein synthesis rates in elderly men. *Br J Nutr* 99, 571-580.
- Koopman R, Walrand S, Beelen M, Gijsen AP, Kies AK, Boirie Y, Saris WH & van Loon LJ (2009) Dietary protein digestion and absorption rates and the subsequent postprandial muscle protein synthetic response do not differ between young and elderly men. *J Nutr* 139, 1707-1713.
- Koopman R & van Loon LJ (2009) Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *J Appl Physiol* 106, 2040-2048.
- Kumar V, Atherton P, Smith K & Rennie MJ (2009) Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol* 106, 2026-2039.
- Larsson L (1982) Physical training effects on muscle morphology in sedentary males at different ages. *Med Sci Sports Exerc* 14, 203-206.

- Larsson L, Li X & Frontera WR (1997) Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 272, C638-C649.
- Lee CE, McArdle A & Griffiths RD (2007) The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin Nutr* 26, 524-534.
- Lexell J, Taylor CC & Sjoström M (1988) What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84, 275-294.
- Liu CJ & Latham NK (2009) Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002759.
- Lombardi A, Silvestri E, Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F, de LP & Moreno M (2009) Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J Proteomics* 72, 708-721.
- Lynch NA, Metter EJ, Lindle RS, Fozard JL, Tobin JD, Roy TA, Fleg JL & Hurley BF (1999) Muscle quality. I. Age-associated differences between arm and leg muscle groups. *J Appl Physiol* 86, 188-194.
- Manini TM, Everhart JE, Anton SD, *et al.* (2009) Activity energy expenditure and change in body composition in late life. *Am J Clin Nutr* 90, 1336-1342.
- Martinez-Vicente M, Sovak G & Cuervo AM (2005) Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 40, 622-633.
- Marzani B, Balage M, Venien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D & Mosoni L (2008) Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *J Nutr* 138, 2205-2211.
- Meredith CN, Frontera WR, O'Reilly KP & Evans WJ (1992) Body composition in elderly men: effect of dietary modification during strength training. *J Am Geriatr Soc* 40, 155-162.
- Millward DJ, Fereday A, Gibson N & Pacy PJ (1997) Aging, protein requirements, and protein turnover. *Am J Clin Nutr* 66, 774-786.
- Milne AC, Potter J, Vivanti A & Avenell A (2009) Protein and energy supplementation in elderly people at risk from malnutrition. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003288.
- Mistry SK, Greenfield Z, Morris SM, Jr. & Baylis C (2002) The 'intestinal-renal' arginine biosynthetic axis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 123, 1159-1165.
- Moinard C, Dauge V & Cynober L (2004) Ornithine alpha-ketoglutarate supplementation influences motor activity in healthy rats. *Clin Nutr* 23, 485-490 (résumé).

- Moinard C & Cynober L (2007) Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis. *J Nutr* 137, 1621S-1625S.
- Moinard C, Jourdan M, Walrand S, Le Plenier S, Boirie Y & Cynober L (2007a) La citrulline exerce un effet direct sur la synthèse protéique musculaire. *Nutr Clin Metabol* 21, 31-32 (résumé).
- Moinard C, Le Plenier S, Perret C & Cynober L (2007b) La Citrulline module la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via l'activation de S6R et de P70S6 kinase1. *Nutr Clin Metabol* 21, 32 (résumé).
- Moinard C., Walrand S., Boirie Y., Cynober L. Utilisation de la citrulline pour le traitement des pathologies liées à une augmentation de la carbonylation des protéines. Brevet déposé le 22 mars 2007 sous le n° 07/02090.
- Moinard C, Nicolis I, Neveux N, Darquy S, Benazeth S & Cynober L (2008) Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrodose pharmacokinetic study. *Br J Nutr* 99(4), 855-62.
- Moinard C, Le Plenier S, Kharchi C, Cynober L & Raynaud-Simon A (2009) Un apport prolongé en citrulline modifie profondément la composition corporelle du rat âgé sain. *Nutr Clin Metabol* 23, 28 (résumé).
- Monroe MB, Van Pelt RE, Schiller BC, Seals DR & Jones PP (2000) Relation of leptin and insulin to adiposity-associated elevations in sympathetic activity with age in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 1183-1187.
- Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, Tang JE, Glover EI, Wilkinson SB, Prior T, Tarnopolsky MA & Phillips SM (2009) Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr* 89, 161-168.
- Morais JA, Gougeon R, Pencharz PB, Jones PJ, Ross R & Marliss EB (1997) Whole-body protein turnover in the healthy elderly. *Am J Clin Nutr* 66, 880-889.
- Mosoni L, Houlier ML, Mirand PP, Bayle G & Grizard J (1993) Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats. *Am J Physiol* 264, E614-E620.
- Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY & Mirand PP (1995) Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol* 268, E328-E335.
- Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D & Mirand PP (1999) Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *Am J Physiol* 277, E608-E616.

- Mosoni L, Breuille D, Buffiere C, Obled C & Mirand PP (2004) Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp Gerontol* 39, 203-210.
- Muscaritoli M, Anker SD, Argiles J, *et al.* (2010) Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr* 29, 154-9.
- Nair KS (1995) Muscle protein turnover: methodological issues and the effect of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50, 107-112.
- Newman AB, Haggerty CL, Goodpaster B, Harris T, Kritchevsky S, Nevitt M, Miles TP & Visser M (2003) Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 51, 323-330.
- O'Connell K, Gannon J, Doran P & Ohlendieck K (2007) Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med* 20, 145-153.
- Oliveira MR, Fogaca KC & Leandro-Merhi VA (2009) Nutritional status and functional capacity of hospitalized elderly. *Nutr J* 17, 8-54.
- Osowska S, Moinard C, Neveux N, Loi C & Cynober L (2004) Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut* 53, 1781-1786.
- Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L & Moinard C (2006) Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E582-E586.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Zhang XJ, Volpi E, Wolf SE, Aarsland A, Ferrando AA & Wolfe RR (2004) Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E321-E328.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR & Ferrando AA (2005) Exogenous amino acids stimulate human muscle anabolism without interfering with the response to mixed meal ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E761-E767.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Katsanos CS, Zhang XJ & Wolfe RR (2006) Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Exp Gerontol* 41, 215-219.
- Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW, Volpi E & Wolfe RR (2008) Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr* 87, 1562S-1566S.
- Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK & Fielding RA (2003) Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R1086-R1090.

- Pencharz PB & Ball RO (2003) Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr* 23, 101-116.
- Piec I, Listrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG & Bechet D (2005) Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* 19, 1143-1145.
- Proctor DN, Balagopal P & Nair KS (1998) Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr* 128, 351S-355S.
- Prod'homme M, Rieu I, Balage M, Dardevet D & Grizard J (2004) Insulin and amino acids both strongly participate to the regulation of protein metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 71-77.
- Proud CG (2007) Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem Soc Trans* 35, 1187-1190.
- Rajantie J, Simell O, Rapola J & Perheentupa J (1980) Lysinuric protein intolerance: a two-year trial of dietary supplementation therapy with citrulline and lysine. *J Pediatr* 97, 927-932.
- Raynaud-Simon A (2009) Particularités du contrôle de la prise alimentaire et altération du goût liée à l'âge. In Hébuterne X, Alix E, Raynaud-Simon A & Vellas B, *Traité de nutrition de la personne âgée*, Paris: Springer-Verlag, pp. 65-72.
- Reddy G & Dalmaso EA (2003) SELDI ProteinChip(R) Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications. *J Biomed Biotechnol* 2003, 237-241.
- Remond D, Machebeuf M, Yven C, Buffiere C, Mioche L, Mosoni L & Patureau MP (2007) Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 85, 1286-1292.
- Rennie MJ, Edwards RH, Halliday D, Matthews DE, Wolman SL & Millward DJ (1982) Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. *Clin Sci (Lond)* 63, 519-523.
- Rennie MJ (2005) Body maintenance and repair: how food and exercise keep the musculoskeletal system in good shape. *Exp Physiol* 90, 427-436.
- Rennie MJ, Selby A, Atherton P, Smith K, Kumar V, Glover EL & Philips SM (2010) Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scand J Med Sci Sports* 20, 5-9.
- Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L & Dardevet D (2006) Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol* 575, 305-315.

- Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J & Dardevet D (2007) Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* 23, 323-331.
- Rimando AM & Perkins-Veazie PM (2005) Determination of citrulline in watermelon rind. *J Chromatogr A* 1078, 196-200.
- Robert JJ, Bier D, Schoeller D, Wolfe R, Matthews DE, Munro HN & Young VR (1984) Effects of intravenous glucose on whole body leucine dynamics, studied with 1-¹³C-leucine, in healthy young and elderly adults. *J Gerontol* 39, 673-681.
- Roberts SB, Young VR, Fuss P, Heyman MB, Fiatarone M, Dallal GE, Cortiella J & Evans WJ (1992) What are the dietary energy needs of elderly adults? *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 969-976.
- Rodwell VW (1999a) Catabolism of proteins and of amino acid nitrogen. In Murray RK *et al.*, *Harper's Biochemistry* 25th Edition, Norwalk :Appleton & Lange, pp. 313-322.
- Rodwell VW (1999b) Conversion of amino acids to specialized products. In Murray RK *et al.*, *Harper's Biochemistry* 25th Edition, Norwalk :Appleton & Lange, pp. 347-358.
- Rolland Y & Vellas B (2009) Sarcopenia. *Rev Med Interne* 30, 150-160.
- Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS (1996) Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15364-15369.
- Rougé C, Des RC, Robins A, Le BO, Volteau C, De La Cochetiere MF & Darmaun D (2007) Manipulation of citrulline availability in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G1061-G1067.
- Sapolsky RM, Krey LC & McEwen BS (1986) The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging* 7, 331-335.
- Schneider SM, Al-Jaouni R, Pivot X, Braulio VB, Rampal P & Hebuterne X (2002) Lack of adaptation to severe malnutrition in elderly patients. *Clin Nutr* 21, 499-504.
- Schulze PC, Fang J, Kassik KA, Gannon J, Cupesi M, MacGillivray C, Lee RT & Rosenthal N (2005) Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ Res* 97, 418-426.
- Shizgal HM, Martin MF & Gimmon Z (1992) The effect of age on the caloric requirement of malnourished individuals. *Am J Clin Nutr* 55, 783-789.

- Singh MA, Ding W, Manfredi TJ, Solares GS, O'Neill EF, Clements KM, Ryan ND, Kehayias JJ, Fielding RA & Evans WJ (1999) Insulin-like growth factor I in skeletal muscle after weight-lifting exercise in frail elders. *Am J Physiol* 277, E135-E143.
- Smith HJ, Mukerji P & Tisdale MJ (2005) Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res* 65, 277-283.
- Smoliner C, Norman K, Scheufele R, Hartig W, Pirlich M & Lochs H (2008) Effects of food fortification on nutritional and functional status in frail elderly nursing home residents at risk of malnutrition. *Nutrition* 24, 1139-1144.
- Sureda A, Cordova A, Ferrer MD, Perez G, Tur JA & Pons A (2010) L: -Citrulline-malate influence over branched chain amino acid utilization during exercise. *Eur J Appl Physiol* 110, 341-51.
- Symons TB, Schutzler SE, Cocke TL, Chinkes DL, Wolfe RR & Paddon-Jones D (2007) Aging does not impair the anabolic response to a protein-rich meal. *Am J Clin Nutr* 86, 451-456.
- Taylor L, Midgley AW, Christmas B, Madden LA, Vince RV & McNaughton LR (2010) The effect of acute hypoxia on heat shock protein 72 expression and oxidative stress in vivo. *Eur J Appl Physiol* 109, 849-55.
- Timmerman KL, Lee JL, Fujita S, Dhanani S, Dreyer HC, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Volpi E (2010) Pharmacological vasodilation improves insulin-stimulated muscle protein anabolism but not glucose utilization in older adults. *Diabetes*, In press-doi:10.2337/db10-0415.
- Toth MJ & Tchernof A (2006) Effect of age on skeletal muscle myofibrillar mRNA abundance: relationship to myosin heavy chain protein synthesis rate. *Exp Gerontol* 41, 1195-1200.
- Tzankoff SP & Norris AH (1977) Effect of muscle mass decrease on age-related BMR changes. *J Appl Physiol* 43, 1001-1006.
- Ugarte N, Petropoulos I & Friguet B (2009) Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 13, 539-49.
- Vandervoort A (2002) Aging of the human neuromuscular system. *Muscle nerve* 25, 17-25.
- Veerkamp JH, Van Moerkerk HT, Glatz JF & Van H, V (1983) Incomplete palmitate oxidation in cell-free systems of rat and human muscles. *Biochim Biophys Acta* 753, 399-410.
- Ventura G, Sinico F, Moinard C, Cynober L & De Bandt JP (2007) Control of nitrogen homeostasis: intestinal arginine metabolism regulation according to protein supply. *FASEB J* 21, 839-12.
- Verdijk LB, Jonkers RA, Gleeson BG, Beelen M, Meijer K, Savelberg HH, Wodzig WK, Dendale P & van Loon LJ (2009) Protein supplementation before and after exercise does

- not further augment skeletal muscle hypertrophy after resistance training in elderly men. *Am J Clin Nutr* 89, 608-616.
- Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, Koopman R, Wodzig WK, Dendale P & van Loon LJ (2009) Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr* 89, 1468-1475.
- Vermeulen A, Goemaere S & Kaufman JM (1999) Testosterone, body composition and aging. *J Endocrinol Invest* 22, 110-116.
- Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T & Figueiredo-Pereira ME (2007) Aging and regulated protein degradation: who has the UPPER hand? *Aging Cell* 6, 599-606.
- Volpi E, Ferrando AA, Yeckel CW, Tipton KD & Wolfe RR (1998) Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J Clin Invest* 101, 2000-2007.
- Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE & Wolfe RR (1999) Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol* 277, E513-E520.
- Volpi E, Mittendorfer B, Rasmussen BB & Wolfe RR (2000) The response of muscle protein anabolism to combined hyperaminoacidemia and glucose-induced hyperinsulinemia is impaired in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4481-4490.
- Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Wolfe RR (2001) Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA* 286, 1206-1212.
- Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Mittendorfer B & Wolfe RR (2003) Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr* 78, 250-258.
- Wakabayashi Y. (2004) The glutamate crossway. In Cynober L, Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition, Boca Raton : CRC Press, pp. 135-152.
- Walrand S, Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Chassagne J, Raul F, Normand B, Farges MC, Beaufriere B, Vasson MP & Cynober L (2000) Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats. *Am J Clin Nutr* 72, 816-824.
- Walrand S, Short KR, Bigelow ML, Sweatt AJ, Hutson SM & Nair KS (2008) Functional impact of high protein intake on healthy elderly people. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E921-E928.
- Waugh WH, Daeschner CW, III, Files BA, McConnell ME & Strandjord SE (2001) Oral citrulline as arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. *J Natl Med Assoc* 93, 363-371.

- Welle S, Thornton C, Jozefowicz R & Statt M (1993) Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *Am J Physiol* 264, E693-E698.
- Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Macdonald MJ, Macdonald JR, Armstrong D & Phillips SM (2007) Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. *Am J Clin Nutr* 85, 1031-1040.
- Windmueller HG & Spaeth AE (1981) Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* 241, E473-E480.
- Wraight C & Hoogenraad N (1988) Dietary regulation of ornithine transcarbamylase mRNA in liver and small intestine. *Aust J Biol Sci* 41, 435-440.
- Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P, Siddiq M, Dolan KD, Kelly KA, Heaps CL & Meininger CJ (2007) Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 137, 2680-2685.
- Yarasheski KE, Zachwieja JJ & Bier DM (1993) Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *Am J Physiol* 265, E210-E214.
- Yasuhara S, Perez ME, Kanakubo E, Yasuhara Y, Shin YS, Kaneki M, Fujita T & Martyn JA (2000) Skeletal muscle apoptosis after burns is associated with activation of proapoptotic signals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1114-E1121.
- Zeanandin G, Mothe-Satney I, Gautier N, Balage M, Dardevet D, Hébuterne X, Obberghen EV, & Schneider S (2009) Effects of a prolonged leucine supplementation on adipose tissue in elderly rats. *Clinical Nutrition Supplements*, 4, 10-11.
- Zoico E & Roubenoff R (2002) The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. *Nutr Rev* 60, 39-51.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme protéique du corps entier chez l'Homme adulte sain (Beaufrère, 2002).

Figure 2 : Bilan net de phénylalanine à l'état postprandial chez l'adulte jeune ou âgé (Volpi *et al.*, 1998).

Figure 3 : Vitesses fractionnelles de synthèse de protéines musculaires estimées au cours de trois périodes de la vie. Sont évaluées les synthèses de protéines de contraction (chaînes lourdes de la myosine, MHC, A ou sarcoplasmiques, B). Différence significative vs les mesures réalisées dans le groupe de sujets jeunes, $**p < 0,01$ (Balagopal *et al.*, 1997).

Figure 4 : Séquestration splanchnique des acides aminés : l'extraction de leucine est deux fois plus élevée dans l'aire splanchnique chez le sujet âgé ($* p < 0,05$) (Boirie *et al.*, 1997).

Figures 5 : Relation entre l'extraction splanchnique de leucine et la concentration plasmatique de leucine chez l'adulte jeune ou âgé (Boirie *et al.*, 1997).

Figure 6 : A l'état post-absorptif, le *turn-over* protéique n'est pas modifié entre sujets âgés et jeunes ; il ne permet pas d'expliquer la perte de masse musculaire.

6a : Comparaison entre sujets jeunes et sujets âgés de la synthèse et de la dégradation protéiques absolues, corps entier, à l'état post-absorptif (Boirie *et al.*, 1997).

6b : Comparaison entre sujets jeunes et sujets âgés de la synthèse protéique fractionnaire au niveau musculaire, à l'état post-absorptif (Volpi *et al.*, 2001).

Figure 7 : La voie de transduction mTOR correspond à plusieurs étapes, essentiellement d'auto-phosphorylation de protéines (Anthony *et al.*, 2000).

Figure 8 : Composition corporelle de sujets dénutris en fonction de l'âge (Hébuterne *et al.*, 2001).

Figure 9 : Causes et conséquences de la sarcopénie (Greenlund & Nair, 2003).

Figure 10 : Scan d'une tomographie computerisée du milieu de la cuisse chez des sujets jeunes (à gauche) et âgés (à droite) (Koopman & van Loon, 2009).

Figure 11 : La leucine stimule la synthèse protéique musculaire chez les personnes âgées (Rieu *et al.*, 2006).

Figure 12 : Une grande quantité de leucine est nécessaire à la stimulation optimale de la synthèse protéique musculaire chez la personne âgée (Katsanos *et al.*, 2006).

Figure 13 : Cycle inter-organe Arg-Cit-Arg

OCT : ornithine carbamoyltransferase ; Arg : arginine; Cit : citrulline ; Orn : ornithine ; ASS+ASL : argininosuccinate synthetase + lyase (Wakabayashi Y., 2004).

Figure 14 : Contenu protéique et synthèse protéique absolue du *tibialis* de rats âgés dénutris ; ANOVA + test de Duncan : * $p < 0,05$ vs AANE et R (Osowska *et al.*, 2006).

Figure 15 : Effet direct de la citrulline sur des muscles isolés incubés ; ANOVA+PLSD de Fischer ; Effet de la dénutrition : $p < 0,05$, effet de la Citrulline : $p < 0,05$ (Moinard *et al.*, 2007a).

Figure 16 : Stimulation de la synthèse protéique musculaire de la Citrulline *via* la voie mTOR, chez des rats âgés dénutris : * vs AL, $p < 0,05$; α vs R, $p < 0,05$ (Moinard *et al.*, 2007b).

Figure 17 : La réponse anabolique à l'ingestion d'une quantité importante de protéines (110 g de viande rouge) est conservée chez la personne âgée (Symons *et al.*, 2007).

Figure 18 : Taux de synthèse protéique musculaire. UP, régime protéique habituel; HP, régime hyperprotéique; FSR, taux de synthèse fractionnaire (Walrand *et al.*, 2008).

Figure 19 : Le taux de digestion des protéines affecte directement leur utilisation chez les personnes âgées (Dangin *et al.*, 2003).

Figure 20 : Amélioration de la balance azotée par un régime pulsé chez les femmes âgées (15 femmes en bonne santé, âgées de 68 ans en moyenne ; durée de l'étude 14 jours) (Arnal *et al.*, 1999).

Figure 21 : Schéma de l'étude CIPROAGE.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Réduction, exprimée en pourcentage, de la taille des fibres musculaires de sujets âgés (Butler-Browne & Bigard, 2006).

Tableau 2 : Modifications de la composition corporelle après 6 semaines d'un apport protéique pulsé ou étalé sur la journée (Bouillanne *et al.*, 2009).

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide aminé

AAE : acides aminés essentiels

AA NE : acides aminés non essentiels

Arg : arginine

ASL : argininosuccinate lyase

ASS : argininosuccinate synthase

Cit : citrulline

FSR : synthèse protéique fractionnaire

hsp70 : *heat shock 70 kDa protein*

Leu : leucine

MyHC : Chaînes lourdes de myosine

•NO : monoxyde d'azote

NOs : •NO synthase

OCT : ornithine carbamoyl transférase

Orn : Ornithine

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

ANNEXE

PHRC 2007

PROTOCOLE DE RECHERCHE

SUPPLEMENTATION EN CITRULLINE DU SUJET AGE DENUTRI HOSPITALISE, EFFETS SUR LE METABOLISME PROTEIQUE (CIPROAGE)

Protocole version n° 2.1 du 09/02/2009 P070127

PROMOTEUR

Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique d'Ile de France, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Hôpital St Louis, 1 avenue Claude Vellefaux - 75010 Paris

RESPONSABLE DE LA RECHERCHE AU NIVEAU DU PROMOTEUR

Dr Olivier Chassany, DRCD, Hôpital St Louis,

CHEF DE PROJET AU NIVEAU DU PROMOTEUR

Dr Aurélie Guimfack, DRCD, Hôpital St Louis, Tél : 0144841798, aurelie.guimfack@sls.aphp.fr

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR

Pr Jean-Claude Melchior, Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité : Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches,
Tél : 0147107747, Mail : jean-claude.melchior@rpc.aphp.fr

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE

Dr Christian Aussel, Laboratoire de biologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456
Limeil-Brévannes, Tél : 0145958230, Mail : christian.aussel@erx.aphp.fr. Laboratoire de Biologie de la
Nutrition, Université Paris 5, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06. Tél :
0153739945, Fax : 0153739952

INVESTIGATEURS

Centre 1 -Hôpital Emile-ROUX

Investigateur principal :

Dr Olivier Bouillanne, Service de Gériatrie 2, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél : 0145958442, Mail : olivier.bouillanne@erx.aphp.fr

Investigateurs associés :

Dr Isabelle Coulombel, Service de Gériatrie 2, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél : 0145958285, Mail : isabelle.coulombel@erx.aphp.fr

Dr Brigitte Hamon-Vilcot, Service de Gériatrie 2, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél : 0145958338, Mail : brigitte.hamon-vilcot@erx.aphp.fr

Plateau technique

Dr Christian Aussel, Dr Françoise Blondé-Cynober, Laboratoire de Biologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél : 0145958230, Mail: christian.aussel@erx.aphp.fr

M Michel Vayssière, Pharmacie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél: 0145958230, Mail : michel.vayssiere@erx.aphp.fr

Dr Edith Valiente, Radiologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil Brévannes, Tél : 0145958271, Mail : edith.valiente@erx.aphp.fr

Centre 2- Hôpital Albert-CHENEVIER

Investigateur principal :

Pr. Eléna Paillaud, Département hospitalo-universitaire de Médecine Interne et Gériatrie, Hôpital Albert-Chenevier, AP-HP, 40 rue de Mesly, 94000 Créteil, Tél : 0149813074, Mail: elena.paillaud@ach.aphp.fr

Plateau technique

Mme Catherine Divine, Service de Pharmacie, Hôpital Albert-Chenevier, AP-HP, 40 rue de Mesly, 94000 Créteil, Tél : 0149813115, Mail: catherine.divine@ach.aphp.fr

Pr Michel Goossens, Service de Biochimie, Hôpital Henri-Mondor, 51 Avenue Delattre de tassigny, 94010 Créteil, Tél : 0149812866, Mail : michel.goossens@hmo.aphp.fr

Centre 3- Hôpital BICHAT-Claude-BERNARD

Investigateur principal

Dr Agathe Raynaud-Simon, Service de Gériatrie, 46 rue Henri-Huchard, 75018 Paris, Tél : 0140258748 Mail: agathe.raynaud-simon@cfx.aphp.fr

Plateau technique

Pr Geneviève Durand-Gaucher, Service de Biochimie, 46 rue Henri-Huchard, 75018 Paris, Tél : 01402585, Mail: genevieve.durand@cfx.aphp.fr

Pr Philippe Arnaud, Service de Pharmacie, 46 rue Henri-Huchard, 75018 Paris, Tél : 0140258005, Mail : philippe.arnaud@c.aphp.fr

Centre 4- Hôpital Raymond-POINCARE

Investigateur principal :

Pr Jean-Claude Melchior, Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité : Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches, Tél : 0147107747, Mail: jean-claude.melchior@rpc.aphp.fr

Investigateurs associés :

Dr Pascal Crenn, Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité : Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches, Tél : 0147107747, Mail: pascal.crenn@rpc.aphp.fr

Plateau technique

Pr Philippe Seizeilles de Mazancourt, Service de Biochimie, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches, Tél : 0147107747, Mail: philippe.seizeilles-de-mazancourt@rpc.aphp.fr

Pr Christian Vallée, Service de Radiologie, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches, Tél : 0147107041, Mail: christian.vallee@rpc.aphp.fr

Mme Françoise Fleur, service de Pharmacie, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, 104 Bd Raymond Poincaré, 92380 Garches, Tél : 0147107041, Mail: francoise.fleur@rpc.aphp.fr

Centre 5- Hôpital Charles-FOIX

Investigateur principal :

Dr Sylvie Meaume, Service de Gériatrie-L'Orbe, Joseph Babinski, Hôpital Charles-Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry sur seine cédex 5, Tél : 0149594504, Mail: sylvie.meaume@cfx.aphp.fr

Investigateurs associés :

Dr Christine Forasassi, Service de Gériatrie-L'Orbe, Joseph Babinski, Hôpital Charles-Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry sur seine cédex 5, Tél : 0149594504, Mail: christine.forasassi@cfx.aphp.fr

Plateau technique

Pr Jean-Louis Beaudeau, Service de Biochimie, Hôpital Charles-Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry sur seine Cedex 5, Tél : 0149594625, mail : jean-louis.beaudeau@cfx.aphp.fr

Dr Anna Sarfati, Service de Pharmacie, Hôpital Charles-Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry sur seine Cedex 5, Tél : 0149594610, mail : anna.sarfati@cfx.aphp.fr

RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

Dr Christian Aussel, Laboratoire de biologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil-Brévannes, Tél : 0145958230, Mail : christian.aussel@erx.aphp.fr

Pr. Luc Cynober et Dr. Christophe Moinard, Laboratoire de Biologie de la Nutrition, Université Paris 5, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, Tél : 0153739945, Mail : luc.cynober@htd.ap-hop-paris.fr, christophe.moinard@pharmacie.univ-paris5.fr

Pr. Yves Boirie et Dr. Stéphane Walrand, Laboratoire de Nutrition Humaine, UR 358 INRA, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand, Tél : 0473608250, Mail: yves.boirie@clermont.inra.fr, stephane.walrand@clermont.inra.fr

BIOLOGISTES

Dr Valérie Nivet-Antoine, Service de Biochimie, Hôpital Charles-Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry sur seine Cedex 5, Tél : 0149594625, mail : valerie.nivet-antoine@cfx.aphp.fr

Pr Dominique Porquet, Service de Biochimie Hormonologie A, Hôpital Robert Debré, AP-HP, 48 Bd Sérurier, 75019 Paris, Tél : 0140034707, Mail : dominique.porquet@rdb.aphp.fr

Dr Nathalie Neveux, Service de Biochimie, Hôpital Hotel-Dieu, AP-HP, 1 place du Parvis. 75001 Paris. Tél : 0142348260, mail : nathalie.neveux@htd.aphp.fr

PHARMACIENS RESPONSABLES DE L'ELABORATION DES PRODUITS

Pr Alain Astier et Dr Muriel Paul, Pharmacie, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, Tél : 0149812751, mail: alain.astier@hmn.aphp.fr, muriel.paul@hmn.aphp.fr

CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE

Dr Olivier Montagne, responsable, Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, Tél: 0149813781, Mail : olivier.montagne@hmn.aphp.fr

MONITORING

Dr Patrick Maison, Unité de Recherche Clinique, Faculté de médecine, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, Tél : 0149812767, Mail : patrick.maison@hmn.aphp.fr

STATISTICIEN

Dr Patrick Cunin, Faculté de médecine, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, Tél : 0149813798, Mail: cunin@univ-paris12.fr

ETUDIANT THESE UNIVERSITE

Mlle Cécile Faure, Laboratoire de Biologie de la Nutrition, Université Paris V, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, Tél : 0153739945, Fax : 0153739952.

1- RESUME DE L'ETUDE	
Titre de la recherche	Supplémentation en citrulline du sujet âgé dénutri hospitalisé : effets sur le métabolisme protéique. (CIPROAGE)
Promoteur	Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, D.R.C.D
Investigateur Coordonnateur	Pr Jean-Claude Melchior, Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité : Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital Raymond Poincaré, AP-HP, 104 bd Raymond Poincaré, 92380 Garches. Tél: 0147107747, Mail : jean-claude.melchior@rpc.aphp.fr
Responsable scientifique	Dr Christian Aussel, Laboratoire de biologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP, 1 avenue de Verdun, 94456 Limeil-Brévannes. Tél : 0145958230, Fax : 0145958395, Mail : christian.aussel@erx.aphp.fr
Lieu de l'étude	Service de Gériologie 2, Hôpital Emile-Roux, Service de Gériologie, Pavillon l'Orbe, Hôpital Charles-Foix, Hôpital Bichat, Claude-Bernard, Département de Médecine aiguë spécialisée, Hôpital Raymond-Poincaré, Département hospitalo-universitaire de Médecine Interne et Gériatrie, Hôpital Albert-Chenevier.
Période de l'essai et durée	2008-2010 , 2 ans
Objectifs	Evaluation de la synthèse protéique chez les sujets âgés hospitalisés, après un régime de trois semaines apportant quotidiennement, par voie orale, 10 g de L-citrulline.
Méthodologie	Essai prospectif, contrôlé, randomisé, multicentrique, en double aveugle, comparatif sur deux groupes parallèles [un groupe traité et un groupe contrôle iso azoté (acides aminés non essentiels; Ala, Asp, Gly, Ser, Hist, Pro)].
Nombre de sujets prévus	30
Durée de participation de chaque patient	21 jours
Critères d'éligibilité	<u>Critères d'inclusion</u> : sujets âgés hospitalisés en médecine ou en soins de suite et réadaptation, modérément dénutris, de plus de 70 ans, dénutrition modérée récente, selon les critères de l'HAS (30 g/l \leq albuminémie < 35 g/l, ou 18 < IMC < 21 ou un score du MNA < 17 avec albuminémie \geq 30 g/l), Ingesta d'au moins 20 kcal/kg/j et au moins 0,8 g/kg/j de protéines, Réalisation d'un examen médical préalable, CE signé. <u>Critères de non inclusion</u> : durée d'hospitalisation < 21j, CRP > 50 mg/l, insuffisance cardiaque de stade IV, insuffisance digestive grave, insuffisance rénale (Clairance créatinine < 30 ml/mn), insuffisance respiratoire, patient diabétique traité par l'insuline pathologie infectieuse non contrôlée, Traitement par corticoïdes, néoplasies évolutives, phase palliative de pathologie grave, Score Mini Mental status de Folstein (MMS)<18, Nécessité de recourir à une nutrition parentérale, patient sous tutelle, porteur de pace maker, hépatites chroniques actives ou cirrhose, non affiliation à un régime de SS, participation à un autre essai .
Aliment diététique à fin médicale spéciale –posologie –voie d'administration – durée du traitement	L-citrulline par voie orale, à la dose de 10 grammes par jour durant trois semaines.
Produit de comparaison	Mélange d'acides aminés non essentiels (alanine, acide aspartique, glycine, sérine, histidine, proline en quantité équimolaire).
Critères d'évaluation	
♦ <u>Critère principal</u> :	Le flux de synthèse protéique corps entier à l'état post-absorptif mesuré par la dilution isotopique de L-leucine (1- ¹³ C) exprimé en g/kg de masse maigre/24h.
♦ <u>Critères secondaires</u> :	Les paramètres de l'étude du turn-over protéique autre que la synthèse protéique, à l'état post-absorptif et à l'état post-prandial, vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine.
♦ <u>Autres variables</u> :	Poids, IMC, composition corporelle (DEXA, impédancemétrie), activité physique, tolérance clinique, mesures plasmatiques de : transthyrétine, albumine, insuline, IGF1, acides aminés plasmatiques, CRP.
Examen requis pour la recherche :	Prise de sang par ponction veineuse à J1 (soit 11 ml), à J21 sur cathéter veineux recueil de sang en 12 fois (78 ml). Soit au total 89 ml de sang par sujet sur la durée totale de l'étude.

Page de SIGNATURE D'UN PROTOCOLE de recherche biomédicale
par l'investigateur COORDONNATEUR et le représentant du PROMOTEUR

Code de la Recherche biomédicale P070127

Titre : «Supplémentation en citrulline du sujet âgé dénutri hospitalisé, effets sur le métabolisme protéique (CIPROAGE) »

Version N°2.1 du 09/02/2009

Amendement n°1.....

L'investigateur coordonnateur :
Pr Jean-Claude MELCHIOR

Date : __/__/09

Signature :

Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité :
Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales,
Hôpital Raymond Poincaré, AP-HP, 104 bd Raymond
Poincaré, 92380 Garches

Responsable scientifique
Dr Christian AUSSEL

Date : __/__/09

Signature

Laboratoire de biologie, Hôpital Emile-Roux, AP-HP,
1 avenue de Verdun, 94456 Limeil-Brévannes

Le promoteur :
Mr Christophe MISSE

Assistance publique – hôpitaux de Paris
Délégation Interrégionale à la Recherche Clinique
Hôpital Saint Louis
75010 PARIS

Date : __/__/09

Signature :

La recherche a reçu un avis favorable en date du 31/12/2007

2- SOMMAIRE

1- RESUME DE L'ETUDE	4
2- TABLE DES MATIERES	6
3- ABREVIATIONS ET DEFINITIONS	8
4- ETAT DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE	9
5- OBJECTIFS DE L'ETUDE	11
6- PLAN EXPERIMENTAL, METHODOLOGIE	11
6-1- Type d'essai	11
6-2- Mode de recrutement – lieux d'étude	11
6-3- Schéma et conduite de l'étude	11
6-3-1- Bilan pré-inclusion	11
6-3-2- Bilan à J1	11
6-3-3- Mesure de l'activité physique	11
6-3-4- Chronologie de l'essai	12
6-4- Randomisation	16
6-5- Durée de participation à l'étude de chaque patient et durée prévisionnelle de l'étude	16
6-6- Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire	
6-6-1- Arrêts prématurés	
6-6-2- Règle de levée d'insu	
7- SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE	16
7-1- Critères d'inclusion	16
7-2- Critères de non inclusion	17
8- TRAITEMENT ADMINISTRE AUX PERSONNES QUI SE PRETENT A LA RECHERCHE	18
8-1- Traitements	18
8-1-1- Traitements administrés	18
8-1-2- Description des produits	18
8-1-3- Gestion des produits	18
8-1-4- Stockage	18
8-1-5- Retour au promoteur	18
8-2- Prise en charge associée	18
8-3- Méthodes de suivi de l'observance	19
9- CRITERES D'EVALUTION ET DESCRIPTION DES PARAMETRES ET DE LEUR TRAITEMENT	19
9-1- Critères d'évaluation	19
9-1-1- Critère principal	19
9-1-2- Critères secondaires	19
9-1-3- Autres variables analysées	19
9-2- Description des paramètres de l'étude	19
9-2-1- IMC : Indice de Masse Corporelle	19
9-2-2- GNRI: Geriatric Nutritional Risk Index	19
9-2-3- Calcul des ingesta	19
9-2-4- Echelle visuelle analogique de l'appétit	19
9-2-5- Mesure de la composition corporelle	20
9-2-6- Activité physique	20
9-2-7- Créatininémie, Glycémie	20
9-2-8- CRP	20
9-2-9- Albuminémie, Transthyrétinémie	20

9-2-10- IGF1, insulinémie	20
9-2-11- Acides aminés plasmatiques	20
9-2-12-Turn-over protéique	22
9-3- Préparation des solutions isotopiques	22
9-4- Etiquetage des échantillons prélevés	23
9-5- Contrôle, conditionnement des échantillons prélevés	23
9-6- Transport et lieu de réalisation des échantillons prélevés	23
9-7- Réception des échantillons	23
9-8- Volume sanguin prélevé	24
10- EVALUATION DE LA SECURITE	24
10-1- Description des paramètres de sécurité	24
10-2- Méthodes et calendriers prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de la sécurité	25
10-3- Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des évènements indésirables	25
10-4- Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'évènements indésirables	26
11- ANALYSES STATISTIQUES	26
11-1- Nombre de sujets nécessaires	26
11-2- Evaluation de l'efficacité de l'intervention et plan d'analyse	27
12- DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES	27
13- CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE	28
13-1 – Procédures de monitoring	28
13-2- Transcription des données dans le cahier d'observation	29
13-3- Data management	29
13-4- Audit	29
14- ASPECTS LEGAUX, ETHIQUES ET ADMINISTRATIFS	29
14-1- Demande d'autorisation auprès de la DGS	29
14-2- Demande d'avis au Comité de Protection des Personnes	29
14-3- Modifications	29
14-4- Secret professionnel et anonymat	30
14-5- Déclaration CNIL	30
14-6- Note d'information et consentement éclairé	30
14-7- Rapport final de la recherche	30
15- TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	31
16- ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE	31
16-1- Assurance	31
16-2- Engagement scientifique	31
17- REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION	31
18 - DOCUMENTS FOURNIS EN ANNEXES	32
19 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33
20- ANNEXES	34

3- ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

AA : Acide aminé
AANE : Acides aminés non essentiels
ADFMS : Aliment diététique à fin médicale spéciale
ARG : Arginine
ARGase : Arginase
ASS+ASL : Argininosuccinate synthétase + lyase
CIT : Citrulline
Cmax : Concentration plasmatique maximale après administration
CPS I : Carbamoyl phosphate synthétase I
DEXA : Dual Energy X-ray Absorptiometry
EVA : Echelle visuelle analogique
GNRI : Geriatric Nutritional Risk Index
IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor 1
IMC : Indice de Masse Corporelle
KIC : α -cétoisocaproate
LEU : Leucine
MM : Masse maigre
MMS : Mini Mental Status de Folstein
MNA : Mini Nutritional Assessment
OCT : Ornithine carbamoyl transferase
ORN : Ornithine
PNNS : Programme nationale nutrition santé
VCO₂ : Volume de CO₂ expiré

4- ETAT DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE

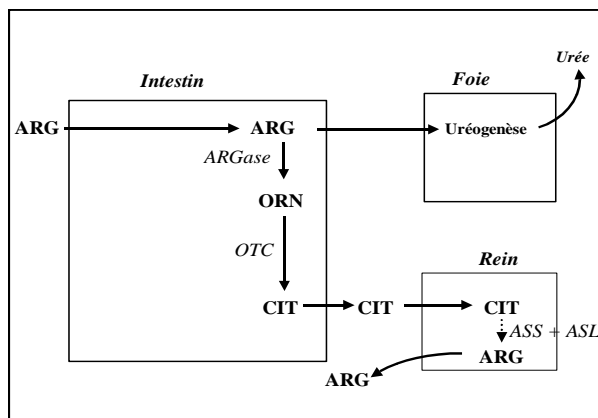
La prévalence de la dénutrition-protéino-énergétique est considérable chez les personnes âgées hospitalisées, variant de 40 à 70%. Il est donc essentiel d'intégrer une prise en charge nutritionnelle de cette population dans la prise en charge globale. Chez l'homme adulte, la prise alimentaire est associée à une augmentation de la synthèse des protéines corporelles et à une diminution de leur dégradation. Ces modifications sont régulées par les hormones et les nutriments. Mais ce sont essentiellement les acides aminés qui jouent le rôle le plus important dans la synthèse protéique post prandiale. En effet dans les régimes sans protéines, malgré l'augmentation de l'insulinémie, il n'y a pas de synthèse des protéines ceci suggérant le rôle prépondérant des acides aminés dans la protéosynthèse. Avec l'âge, il y a des modifications de la réponse métabolique à l'état post prandial, avec une perte de l'effet anabolique du repas conduisant à un défaut de réponse à la renutrition [1]. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène ; celui-ci pourrait être lié, en grande partie, à une utilisation excessive des nutriments (en particulier des acides aminés) par l'aire splanchnique, conduisant à une moindre disponibilité des acides aminés pour les tissus périphériques [2-4]. Ce dernier phénomène correspond à la séquestration splanchnique des acides aminés et particulièrement de la leucine or celle-ci en plus d'être un substrat est également un acide aminé signal puisqu'il stimule spécifiquement des facteurs intracellulaires impliqués dans des voies de signalisation contrôlant la traduction des protéines.

Il est possible qu'une dysrégulation du cycle interorgane Arginine-Citrulline-Arginine (qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie azotée) puisse être à l'origine d'une dégradation excessive des acides aminés (AAs) au niveau de l'aire splanchnique. En effet, l'absorption intestinale des AAs n'est pas limitante : elle est de 95 à 99% dans une très large gamme d'apports protéiques. En fait, le site de contrôle de la disponibilité en azote est le foie qui épure physiologiquement environ 50% de l'azote apporté par l'alimentation [5]. La capacité du foie à éliminer l'excès d'azote est, en partie, régulée par le flux portal d'arginine (ARG), cet AA étant un activateur de la N-acétylglutamate synthétase ; le N-acétyl-glutamate ainsi synthétisé est un activateur allostérique de la Carbamoyl Phosphate Synthétase I (CPS I) [6] enzyme impliquée dans le cycle de l'urée. Ainsi, l'ARG alimentaire stimule sa dégradation ainsi que celle des autres AAs. Cependant, en situation d'apports hypoprotéiques, ce mécanisme ne permet pas de limiter l'uréogénèse de façon suffisante. C'est pourquoi, il existe un second point de contrôle particulièrement actif chez le sujet soumis à un régime hypoprotéique : il s'agit de l'expression intestinale de l'arginase et de l'ornithine carbamoyl transférase (OCT) [7] (voir figure 1). Ainsi, dans une situation de restriction protéique, l'intestin libérerait préférentiellement de la citrulline (CIT) à la place de l'ARG. Or la CIT n'est pas captée par le foie [8]. L'ARG nécessaire est ensuite resynthétisée par les reins qui possèdent les 2 enzymes nécessaires. Ce processus permettrait donc de limiter l'uréogénèse à un niveau proportionnel à celui de l'apport protéique. Il est maintenant admis que ce cycle Arginine-Citrulline-Arginine joue un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme pour le maintien de l'homéostasie azotée.

Des travaux expérimentaux réalisés dans un modèle de dénutrition chez le rat âgé, ont permis de montrer que la citrulline était un puissant activateur de la synthèse protéique [9,10]. Par ailleurs, nos données indiquent que l'administration d'un régime enrichi en CIT génère des quantités importantes d'ARG, lesquelles peuvent expliquer les effets observés [9,10].

Notre hypothèse de travail est qu'il est possible, chez la personne âgée dénutrie, que la citrulline en échappant à la séquestration splanchnique des AA apporte en périphérie l'azote nécessaire à l'anabolisme protéique et stimule celui-ci comme le fait la leucine dans des conditions de régime normal.

Figure 1 : Cycle inter-organe ARG-CIT-ARG (d'après [11])



(*ARGase*: arginase ; *OTC*: ornithine carbamoytransférase ; ARG: arginine; CIT: citrulline ; ORN: ornithine ; *ASS+ASL*: argininosuccinate synthetase + lyase).

Comme pré-requis, il était nécessaire de disposer de données pharmacocinétiques et de tolérance de la CIT car il n'existe que peu de données dans la littérature [12,13]. Une étude de pharmacocinétique et de tolérance chez l'adulte jeune a été réalisée [14]. Ainsi, 8 volontaires sains ont reçu des doses croissantes de CIT (2, 5, 10 et 15 g de CIT) en une prise unique à 15 jours d'intervalle. Les données pharmacocinétiques ont démontré que la CIT est un bon précurseur d'ARG *in vivo* mais que ce phénomène est saturable pour une dose voisine de 15 g ; d'ailleurs la Cmax d'ARG est identique pour une dose de 10g ou de 15 g de CIT. Cette saturation de la capacité de transformation de la CIT en ARG s'accompagne d'une forte augmentation de l'élimination urinaire à la dose de 15 g. Par ailleurs, la tolérance de la CIT est excellente puisque aucun événement indésirable (de type diarrhée osmotique ou hypoglycémie) n'a été rapporté dans cette précédente étude.

Cette étude permettra de mieux comprendre, chez l'homme âgé, le rôle métabolique de la citrulline dans le contrôle de l'homéostasie azoté et notamment son effet sur l'anabolisme protéique.

5- OBJECTIFS DE CETTE ETUDE

Notre hypothèse de travail est qu'il est possible, chez la personne âgée dénutrie, que la citrulline en échappant à la séquestration splanchnique des AA apporte en périphérie l'azote nécessaire à l'anabolisme protéique et stimule celui-ci.

L'objectif est de montrer l'effet de la CIT, sur l'homéostasie azotée en particulier de vérifier son effet stimulant sur la synthèse protéique chez le sujet âgé dénutri.

6- PLAN EXPERIMENTAL, METHODOLOGIE CLINIQUE

6-1- Type d'essai

Il s'agit d'un essai prospectif, contrôlé, randomisé, multicentrique, en double aveugle, comparatif sur deux groupes parallèles, un groupe traité et un groupe contrôle iso azoté.

6-2- Mode de recrutement, lieux d'étude

Les patients inclus dans l'étude seront recrutés par les médecins investigateurs dans cinq centres investigateurs :

- Service de Gériatrie 2, Hôpital Emile-Roux (AP-HP)
- Service de Gériatrie, Hôpital Bichat Claude-Bernard (AP-HP)
- Poincaré Département de Médecine aiguë spécialisée, Unité : Nutrition clinique-Maladies infectieuses et Tropicales Hôpital Raymond-Poincaré (AP-HP)
- Département hospitalo-universitaire de Médecine Interne et Gériatrie, Hôpital Albert-Chenevier (AP-HP)
- Service de Gériatrie, Pavillon l'Orbe, Joseph Babinski, Hôpital Charles-Foix

Chaque centre devra inclure 4 à 8 sujets.

6-3- Schéma et conduite de l'étude

Chaque sujet répondant aux critères d'inclusion et ayant signé le formulaire de consentement aura un bilan à J1 et sera randomisé dans l'un des deux groupes, l'un recevant la CIT (groupe traité), l'autre recevant un mélange d'acides aminés non essentiels (AANE) iso azoté (groupe contrôle).

L'apport nutritionnel sera suivi par une diététicienne ; il sera composé du régime standard proposé par l'hôpital apportant en moyenne 2000 kcal/j et 66 g de protéines (Protides 13%, Lipides 35%, Glucides 52%). Le service incluant le patient, utilisera ses procédures habituelles de prise en charge nutritionnelle pour un patient âgé modérément dénutri avec comme objectif un apport protéique de 1,5 g/protéines/kg et calorique de 35 Kcal/kg. La nutrition entérale ou les compléments oraux, éventuellement utilisés, seront comptabilisés dans les ingesta. Les patients ne recevront pas de pharmaconutriments.

6-3-1- Bilan d'inclusion

Le bilan rentre dans le cadre de la prise en charge de tous les patients admis dans les centres de recrutement. Il n'y a pas de prise de sang et d'examen biologiques réalisés spécifiquement pour ce bilan d'inclusion.

Bilan clinique : examen clinique, poids, taille, IMC, MMS (annexe 2), MNA (annexe 1).

Bilan biologique : albuminémie, CRP, clairance de Cockcroft et Gault, glycémie.

Bilan diététique : recueil des ingesta sur 24 heures

Au terme de ce bilan d'inclusion, un patient est dit inclus dans l'étude dès lors qu'il a reçu une information éclairée sur les bénéfices/risques de l'essai et signé son consentement éclairé. Il lui sera alors attribué un numéro d'inclusion (=n° de randomisation).

6-3-2- Bilan à J1

Le bilan clinique comprendra ; le poids, la taille mesurée vraie ou calculée, si impossibilité de mesure, à partir de la hauteur du genou, l'IMC, la composition corporelle (impédancemétrie et DEXA), et l'échelle visuelle analogique de l'appétit avant le petit-déjeuner;

Le bilan biologique comprendra : créatininémie, albuminémie, CRP, transthyrétinémie, glycémie, insuliniémie, IGF₁, acides aminés plasmatiques, Geriatric Nutritional Risk Index [GNRI, (15)].

Un bilan diététique est réalisé : recueil des ingesta sur 3 jours : J1, J2, J3.

6-3-3- Mesures de l'activité physique

L'exercice physique est une variable importante de l'anabolisme protéique musculaire. Outre la mesure de l'exercice physique réalisé lors de la kinésithérapie associée à la rééducation des patients hospitalisés, ceux-ci seront équipés pendant toute la durée de l'étude d'un podomètre. Celui-ci permettra une évaluation quantitative de l'exercice physique qui sera pris en compte pour l'analyse des données.

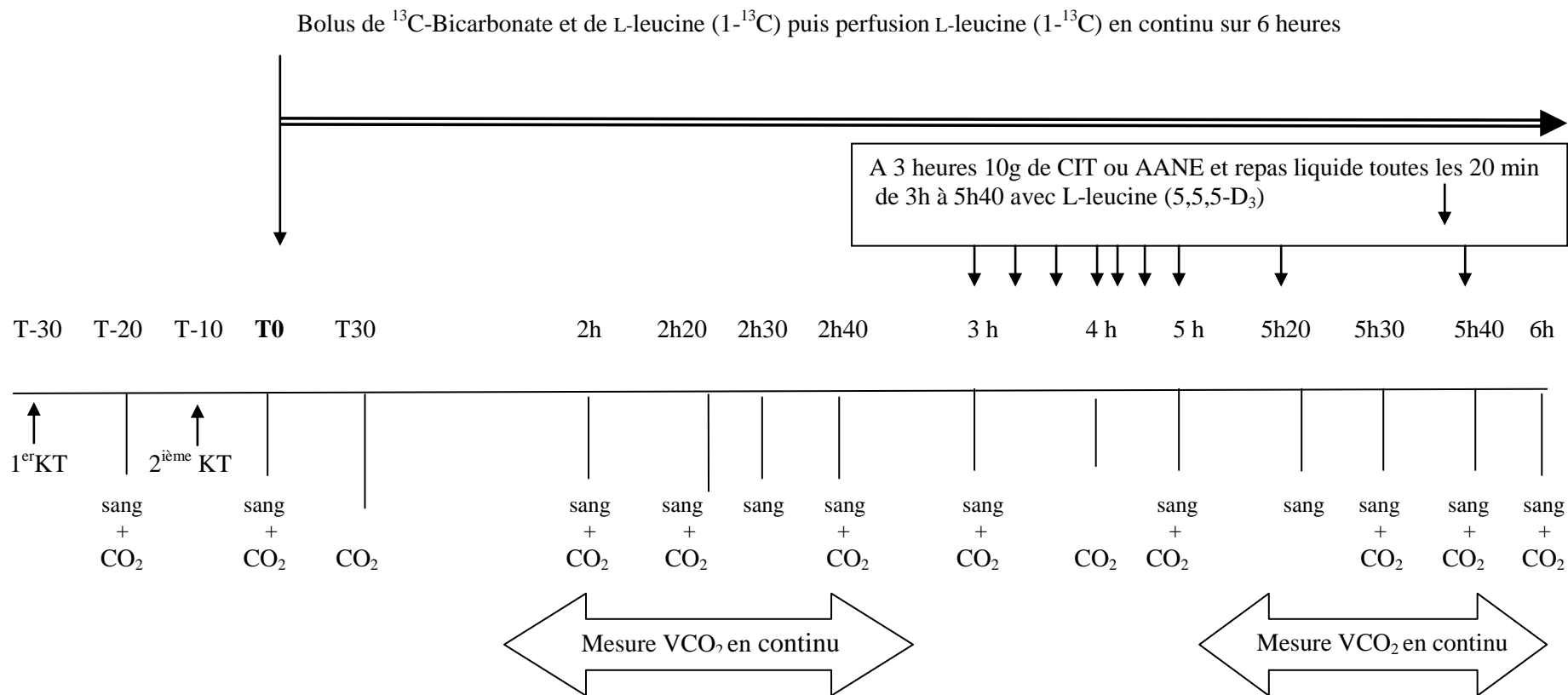
6-3-4-Chronologie de l'essai (Figure 2 et Tableau I)

A partir de J1, les sujets recevront pendant trois semaines, au petit-déjeuner en une prise, soit 10 g de CIT pour le groupe traité soit un complément iso azoté sous forme d'un mélange d'AANE pour le groupe contrôle. Le contenu du sachet (CIT ou AANE) sera dissous dans 150 ml d'eau ou mélangé à un yaourt que le patient devra absorber en 15 minutes. Le complément iso azoté sera formulé de façon à ce que le produit ne puisse être distingué de la CIT par le patient et l'investigateur. Le choix de la dose de citrulline est basé sur des travaux antérieurs réalisés par l'équipe du Pr Cynober et sur les résultats de l'étude Citrudose concernant la pharmacocinétique et la tolérance de la CIT selon qu'elle est administrée à 2, 5, 10 ou 15 grammes chez les sujets sains [14]. Dans cette étude, la tolérance de la CIT a été excellente quelle que soit la dose utilisée. La cinétique était dose dépendante, un phénomène de saturation métabolique survenant pour un apport de 15 grammes de CIT, la dose de 10 g est retenue. Le seul risque lié à la citrulline est d'un éventuel trouble gastrique au début du traitement.

- Tous les jours, la tolérance clinique sera évaluée et l'activité physique sera mesurée grâce à un podomètre.
- **A J1**, les patients des hôpitaux ne possédant pas de DEXA (Hôpital Albert-Chenevier, Hôpital Charles-Foix) seront transportés le matin par ambulance à l'hôpital Emile-Roux pour cet examen.
- **A J1, J2, J3, J12, J13, J14 et J18, J19, J20**, les patients auront un recueil des ingesta
- **A J20**, les patients des hôpitaux ne possédant pas de DEXA (hôpital Albert-Chenevier, Hôpital Charles-Foix) seront transportés le matin par ambulance à l'hôpital Emile-Roux pour cet examen. Le poids, l'IMC, la composition corporelle (DEXA et impédancemétrie), et l'échelle visuelle analogique de l'appétit avant le petit-déjeuner sont mesurés ou évalués.
- **A J21 (mesure du critère principal de jugement, flux de synthèse protéique)**, à jeun depuis la veille 22 h, les patients recrutés dans les cinq centres seront transportés en ambulance au Centre d'Investigation Clinique de l'hôpital Henri-Mondor (Dr Olivier Montagne) – admission vers 08h30.
 - A T-30 min, un 1^{er} cathéter est posé pour les prélèvements sanguins
 - A T-20 min, un prélèvement sanguin est réalisé pour mesurer l'abondance naturelle isotopique en leucine.
 - A T-10 min, un calorimètre est installé de façon à mesurer la production de CO₂ (VCO₂) et un 2^{ème} cathéter est posé pour la perfusion du traceur.
 - A T0,
 - Des prélèvements sanguins sont réalisés pour la mesure de la créatininémie, albuminémie, transthyrétinémie, glycémie, insulínémie, CRP, IGF1, acides aminés plasmatiques, enrichissement isotopique en Leucine et en albumine..
 - Les patients sont allongés, un cathéter est posé sur le bras opposé pour recevoir un bolus de L-leucine (1-¹³C) (contenant 0,10 µmoles/kg de masse maigre) et 6 mg de ¹³C bicarbonate, puis une perfusion IV continue L-leucine (1-¹³C) (0,10 µmoles/kg de masse maigre/min soit 258 mg perfusés durant 6h pour un sujet ayant 50 kg de masse maigre (MM).
 - Un prélèvement d'air expiré est réalisé.
 - T 30 : prélèvement d'air expiré
 - T 2h à T 3h : une mesure de la VCO₂ est effectuée par calorimétrie durant 60 min ainsi que des prélèvements sanguins à 2h, 2h20, 2h30, 2h40 et 3h et 4 mesures de l'air expiré.

- T 3h : début de l'alimentation orale liquide fractionnée [50 ml toutes les 20 min durant deux heures quarante,[donc 9 fois 50 ml], contenant des protéines sous forme de protifar, des maltodextrines, de l'huile alimentaire et de la L-leucine (5,5,5-D₃). La quantité de L-leucine (5,5,5-D₃) sera de 0.10 µmoles/kg de MM/min soit 18 µmoles/kg de MM. Les 10 g de CIT ou d'AANE iso azoté seront ajoutés, en fonction du groupe, dans les premiers 50 ml de mélange liquide oral.
- T 4h : prélèvement d'air expiré
- T 5h à T 6h : début d'une nouvelle mesure de la VCO₂ pendant 60 minutes.
- T 5h, 5h20, 5h30, 5h40 et T 6h : prélèvement d'air expiré (sauf à 5h20) et prélèvements sanguins
- T 6h, la perfusion est enlevée

Les heures exactes des prélèvements seront reportées dans le cahier d'observation.



1^{er} KT = 1^{er} cathéter posé pour les prélèvements sanguins

2^{ème} KT = 2^{ème} cathéter pour la perfusion du traceur

VCO₂ = Mesure par calorimétrie indirecte

Recueils du CO₂ (en expirant dans un tube sec immédiatement rebouché),

Avant la perfusion de L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) recueils sanguins pour le dosage des paramètres biologiques.

Figure 2 : Chronologie de l'essai

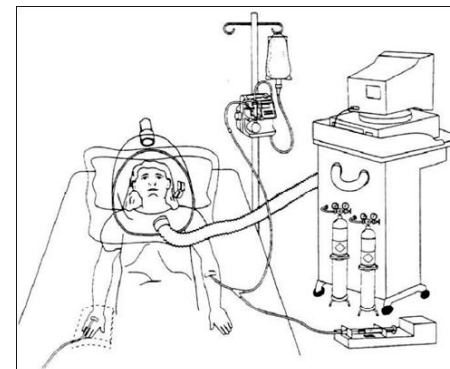


Tableau I
Chronologie et contenu des visites

	J1	Tous les jours	J1, 2, 3 J12, 13, 14, J18, 19, 20	J20	J21
Examen clinique	x				
Poids, taille	x			x	
IMC (1)	x			x	
Impédancemétrie	x			x	
EVA de l'appétit avant le petit-déjeuner	x			x	
CRP	x				x
Créatininémie, albuminémie, transthyrélinémie, glycémie	x				x
Clairance de la créatinine calculée selon Cockcroft et Gault	x				x
IGF ₁ , insulinémie	x				x
Acides aminés plasmatiques	x				x
GNRI (2)	x				x
Recueil des ingesta (3)	x		x		
DEXA (4)*	x			x	
Mesure dilution isotopique (1- ¹³ C) leucine					x
Tolérance clinique (5)		x			
Activité physique (podomètre)		x			

(1) Index de Masse Corporelle (poids/taille ²)

(2) Geriatric Nutritional Risk Index (annexe 3)

(3) Recueil 3 jours consécutifs (annexe 4)

(4) Cet examen sera fait à l'hôpital Emile-Roux pour les patients inclus à Emile-Roux, Charles-Foix et Albert-Chenevier, ou à Raymond-Poincaré ou à Bichat-Claude-Bernard.

(5) Tolérance clinique (Annexe 5)

* La mesure de la composition corporelle par DEXA, pour faciliter l'organisation, pourra être réalisée dans les deux jours précédents J1 et J20

6-4- Randomisation

L'URC de Henri-Mondor est responsable de la randomisation. Elle transmettra un exemplaire de la feuille de randomisation sous pli à la DRCD. Celle-ci sera centralisée au niveau de l'URC de Henri-Mondor. L'essai étant multicentrique, la randomisation devra être stratifiée par centre (établissement d'une liste de randomisation pour chaque centre). L'attribution des numéros sera faite dans l'ordre chronologique d'inclusion des sujets dans l'étude.

6-5- Durée de participation à l'étude de chaque patient et durée prévisionnelle de l'étude

La durée de participation à l'étude de chaque patient est de trois semaines.

La durée totale prévisionnelle de la recherche est de 2 ans à compter de la première inclusion, pendant lesquels 30 patients devront être inclus.

6-6- Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire

6-6-1- Arrêts prématurés

A tout moment, un sujet pourra arrêter prématurément sa participation à l'essai, soit à sa demande, soit sur décision de l'investigateur, et notamment dans les circonstances suivantes :

- Sujet retirant son consentement
- Violation du protocole : non administration du produit de l'essai, sujet inclus à tort, non respect des conditions pratiques de réalisation
- Apparition d'un événement indésirable nécessitant, selon l'investigateur, la sortie de l'étude
- Survenue secondaire d'un critère de non inclusion
- Survenue secondaire d'une pathologie non imputable au produit évalué, mais pouvant interférer avec les paramètres mesurés

Quelle que soit la raison de sortie de l'essai du sujet, celle-ci devra être clairement mentionnée dans le cahier d'observation et les documents pouvant la justifier seront joints.

6-6-2- Règles de levée d'insu

Dans la mesure du possible, si nécessaire, l'investigateur coordonnateur pourra, aux horaires ouvrables, demander la levée d'insu, auprès du promoteur.

7- SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE

7-1- Critères d'inclusion

- Sujets âgés hospitalisés en médecine ou soins de suite et réadaptation > 70 ans
- Dénutrition modérée récente, selon les critères de l'HAS:
30 g/l ≤ albuminémie < 35 g/l
ou 18 < indice de masse corporelle (IMC) < 21
ou score du Mini Nutritional Assessment (MNA) ≤ 17 mais albuminémie ≥ 30g /l
- Acceptant de participer à l'étude après avoir lu et compris le document écrit d'information et signé le formulaire de consentement.
- Ingesta d'au moins 20 kcal/kg/jour et d'au moins 0,8 g/kg/jour de protéines
- Réalisation d'un examen médical préalable

7-2- Critères de non inclusion

- Durée prévisible d'hospitalisation inférieure à 21 jours
- Syndrome inflammatoire résiduel (CRP > 50 mg/l)
- Insuffisance cardiaque de stade IV
- Insuffisance rénale (Clairance de Cockcroft et Gault < 30ml/mn)
- Diabète non contrôlé (glycémie à jeun > 7,5 mmol/l malgré le traitement)
- Patient diabétique traité par l'insuline
- Pathologie infectieuse non contrôlée
- Traitement par corticoïdes
- Insuffisance respiratoire (hypercapnie de base, nécessité d'une oxygénothérapie même intermittente)
- Insuffisance digestive grave :
. Gastrectomie datant de moins d'un an

- . Pancréatite chronique, résection du pancréas, fibrose kystique du pancréas
- . Pathologie inflammatoire du tube digestif
- . Ischémie intestinale
- . Lymphome intestinal
- Nécessité de recourir à une nutrition parentérale
- Toutes néoplasies évolutives
- Phase palliative de pathologie grave (cancer, ...) ou patients dont l'espérance de vie serait inférieure à 6 mois
- Score Mini Mental Status de Folstein (MMS) inférieur à 18
- Patient incapable majeur ou sous tutelle
- Patient porteur d'un pace maker (contre indication pour la mesure par impédancemétrie)
- Chimiothérapie
- Hépatites chroniques actives ou cirrhose
- Non affiliation à un régime de sécurité sociale ou sans CMU
- Participation concomitante à un autre essai clinique

8-TRAITEMENT ADMINISTRE AUX PERSONNES QUI SE PRETENT A LA RECHERCHE

8-1- Produits

8-1-1- Produits administrés

1 sachet contenant 10 g de L-Citrulline, 1 fois le matin durant 21 jours

ou

1 sachet contenant une quantité iso azotée d'acides aminés non-essentiels (alanine, acide aspartique, glycine, sérine, histidine, proline en quantité équimolaire), 1 fois le matin durant 21 jours. L'apport de 6 AAs différents permet d'utiliser chacun à une dose faible qui permet de se prémunir d'un effet pharmacologique [16].

8-1-2- Description des produits

Fournisseur

La L-citrulline, la L-Alanine, l'acide L-Aspartique, la L-Glycine, la L-Histidine, la L-Proline et la L-Sérine sont fournis par la société Kyowa Hakko Kogyo CO., LTD, (Tokyo, Japon). Ces produits sont conformes à une alimentation orale, la société a fourni un certificat d'alimentarité (aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales arrêté du 5 juin 2003) (annexe 6).

Conditionnement

Les produits seront conditionnés par la PUI de l'hôpital Henri-Mondor pour :

- les 30 sujets prévus dans ce protocole, numérotés de 1 à 8 à l'intérieur de chaque centre
- la randomisation étant faite au préalable de façon à conditionner les sachets qui contiendront soit la CIT, soit les AANE.

Etiquetage

Chaque étui portera une étiquette ayant les indications :

- CIPROAGE
- Sujet n° x à xx et N° de Randomisation
- Le n° de lot et le numéro du centre d'inclusion et la date de péremption
- Utilisation sous stricte surveillance médicale – Art. L5137-1 du Code de la Santé Publique

8-1-3- Gestion des produits

- Les produits seront fournis par la PUI de l'hôpital Henri-Mondor aux pharmacies de l'hôpital ayant inclus le sujet (21 sachets par inclusion).
- Les numéros de lot.
- Les certificats d'analyses comportant les dates de péremption des formes pharmaceutiques utilisées pour le conditionnement.
- Les enveloppes scellées de décodage.

8-1-4- Stockage

Aucune condition particulière de stockage ne sera nécessaire hormis celle qui concerne les traitements pour essai clinique, conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques.

Etude multicentrique CIPROAGE version n° 2.1 du 09/02/2009

8-1-5- Retour au promoteur

En fin d'essai, l'ARC en charge de l'étude récupérera auprès de la pharmacie l'ensemble du matériel de l'étude, les conditionnements utilisés ou non-utilisés, le jeu des enveloppes de décodage scellées, la feuille de comptabilité des produits, la fiche signée de retour des produits au promoteur.

8-2- Prise en charge associée

Outre les traitements médicaux habituels, que nécessitent l'état clinique du patient, une kinésithérapie d'accompagnement sera proposée à chaque malade, adaptée à chaque situation clinique et à l'évolution et au progrès réalisé par le patient au cours de la renutrition. Les actes de kinésithérapie seront rapportés dans le cahier d'observation dans la partie traitements associées.

8-3- Méthodes de suivi de l'observance

L'Attaché(e) de recherche clinique en charge de l'étude effectuera des visites de monitoring régulières dans les pharmacies de chaque centre afin d'y effectuer le décompte des sachets délivrés dans le service et retournés à la pharmacie pour chaque patient.

9- CRITERES D'EVALUATION ET DESCRIPTION DES PARAMETRES ET DE LEUR TRAITEMENT

9-1 Critères d'évaluation

9-1-1- Critère principal

Le flux de synthèse protéique corps entier à l'état post-absorptif.

9-1-2- Critères secondaires

Les paramètres de l'étude du turn-over protéique autre que la synthèse protéique:

- A l'état post-absorptif ; le turn-over protéique, le flux de dégradation des protéines, l'oxydation
- A l'état post-prandial : le turn-over protéique, le flux de dégradation des protéines, l'oxydation, le flux de synthèse des protéines et la séquestration splanchnique de la leucine.
- La vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine.

9-1-3 Autres variables analysées

- Les paramètres biologiques (J1 et J21) : créatininémie, CRP, albuminémie, transthyrétinémie, glycémie, insulinémie, IGF-1 plasmatique, aminoacidogramme plasmatique.
- La tolérance clinique de la supplémentation en citrulline (diarrhée, nausée, épigastralgie) sera évaluée par la survenue ou non d'événements indésirables (annexe 7). Il n'y pas de risque connu à une supplémentation de ce type.
- Les paramètres cliniques (J1 et J21): le poids, la composition corporelle (impédancemétrie), l'IMC
- La mesure des ingesta (début, milieu et fin d'étude).
- L'activité physique mesurée par un podomètre.

9-2- Description des paramètres de l'étude

9-2-1- IMC : Index de Masse Corporelle

$$\text{IMC} = \text{poids(kg)} / \text{taille}^2(\text{m}^2)$$

La taille est mesurée avec une toise si les conditions le permettent ou est calculée à l'aide de la hauteur du genou en utilisant la formule de Chumlea (annexe 3).

Le poids est mesuré sur des balances médicales. Il sera procédé à un contrôle d'assurance qualité par une société de service qui mesurera la justesse et la précision des balances au début de l'étude puis deux fois par an.

9-2-2- GNRI : Geriatric Nutritional Risk Index

Le GNRI (annexe 4) fera partie du bilan d'entrée des patients. Le poids théorique est calculé en fonction de la taille et du sexe des patients selon la formule de Lorentz. Le GNRI a été validé comme score de morbi-mortalité lié à la dénutrition chez le sujet âgé hospitalisé [15]

9-2-3- Calcul des ingesta

Etude multicentrique CIPROAGE version n° 2.1 du 09/02/2009

Une mesure des ingesta sera faite, en effectuant la moyenne des résultats obtenus sur tous les repas pendant trois jours consécutifs. Le support sera la fiche d'observation alimentaire (annexe 4), complétée lors de chacun des repas. Les données sont recueillies par un logiciel spécialisé et traduites en apports en calories (kcal/j), lipides (g/j), glucides (g/j) et protides (g/j). Le recueil des ingesta et le calcul sera réalisé par la diététicienne chargée de l'étude dans chacun des centres investigateurs.

9-2-4- Echelle visuelle analogique de l'appétit

L'évaluation de l'appétit à l'aide d'une échelle visuelle analogique (cotation de 0 à 10) sera faite avant le petit-déjeuner.

9-2-5- Mesure de la composition corporelle

- Impédance bioélectrique (Appareil Analycor version 4/5 W, Spengler – 19 rue de la Gare – 94230 CACHAN)

Cette mesure permettra d'évaluer les modifications de la composition corporelle entre J1 et J21 [17].

La mesure est parfaitement indolore et sans risque. Le principe de la mesure repose sur la relation entre la résistance opposée à un courant électrique de faible intensité (de l'ordre du micro-ampère) et le volume conducteur. Avec le matériel utilisé, 3 fréquences sont appliquées : 5, 50 et 100 kHz. Des électrodes de surface (type ECG) sont disposées à la main et au pied (tête du 2ème métacarpien et ligne inter-malléolaire), la valeur retenue sera la moyenne des deux mesures. La mesure sera réalisée entre les électrodes du côté droit (main-pied) puis entre les électrodes du côté gauche (main-pied).

- Absorptiométrie biphotonique (DEXA) (Appareil LUNAR PRODIGY ADVANCE Grande Table, densitomètre numérique à conversion directe nouvelle génération XP, GE Medical Systems Ultrasound & Primary Care Diagnostics France, 11 avenue Maorane Saulnier 78457 VELIZY Cedex).

Cette mesure est nécessaire d'une part pour connaître la quantité de L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) à perfuser et la quantité de L-Leucine ($5,5,5\text{-D}_3$) à faire ingérer et d'autre part pour exprimer les résultats des mesures du turn-over protéique.

Ces examens sont réalisés sous la responsabilité du Dr Valiente, radiologue pour les patients des hôpitaux Emile-Roux, et Albert-Chenevier. Pour les patients de l'hôpital Raymond-Poincaré et Bichat Claude-Bernard la DEXA sera réalisée sur place par un appareil HOLOGIC. Les DEXA seront étalonnées avec des fantômes identiques pour obtenir des mesures comparables. L'examen effectué, en position allongée, totalement indolore et sans risque, dure environ 4 min. L'irradiation reçue par le patient est faible par rapport à une radiographie standard. L'absorptiomètre biphotonique consiste à effectuer un balayage de l'ensemble du corps avec un faisceau très fin de rayons X à deux niveaux d'énergie. Ce faisceau, en traversant le corps du patient va subir une atténuation dépendante de la composition de la matière traversée. L'utilisation de deux énergies très différentes permet d'individualiser 3 composants : la masse calcique, la masse maigre et la masse grasse.

La précision et l'exactitude obtenues en font la méthode de référence de la mesure de la masse corporelle.

9-2-6- Activité physique

Un podomètre placé à la ceinture de chaque patient inclus dans l'étude permettra de quantifier l'activité physique en nombre de pas par jour.

9-2-7- Créatininémie, glycémie

Ces marqueurs permettront d'apprécier respectivement la tolérance rénale et glycémique.

9-2-8- CRP

Les valeurs de la CRP à la fin de l'inclusion permettront de s'assurer de l'absence d'un syndrome inflammatoire intervenant en cours d'étude.

9-2-9- Albuminémie, Transthyrélinémie

L'albumine et la transthyréline sont les deux protéines marqueurs de l'état nutritionnel.

9-2-10- IGF1, insulínémie

Ces hormones sont impliquées dans le métabolisme protéique, nous rechercherons si le traitement induit des modifications de sécrétion.

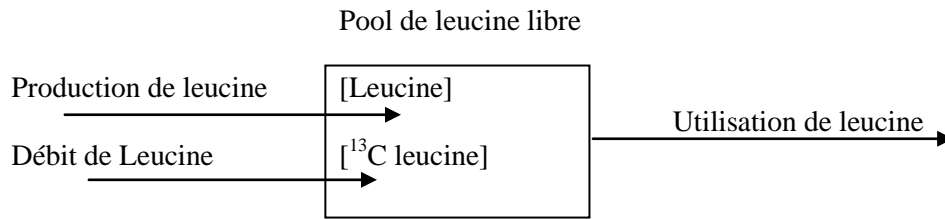
9-2-11- Acides aminés plasmatiques

La mesure des concentrations plasmatiques des acides aminés est nécessaire à la mesure du turn-over protéique par dilution isotopique d'une part et d'autre part elle nous renseigne sur les modifications de la valeur de la citrullinémie et des acides aminés métaboliquement associés, après le traitement.

9-2-12-Turn-over protéique

La mesure du turn-over protéique est réalisée par une technique utilisant un isotope stable (non radioactif) de la leucine, la L-Leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$). L'utilisation de la L-Leucine ($5,5,5\text{-D}_3$) permet l'étude du turn-over protéique à l'état post-prandial. Il s'agit d'une méthode dynamique qui donne accès à la synthèse et au catabolisme au niveau corps entier ainsi qu'à l'oxydation des acides aminés à l'état basal et à l'état post prandial. Le principe est la réalisation d'une dilution isotopique.

On introduit dans le plasma de la L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) à un débit constant et connu pour atteindre un état stationnaire. Lorsque l'équilibre est atteint :



A l'état stationnaire :

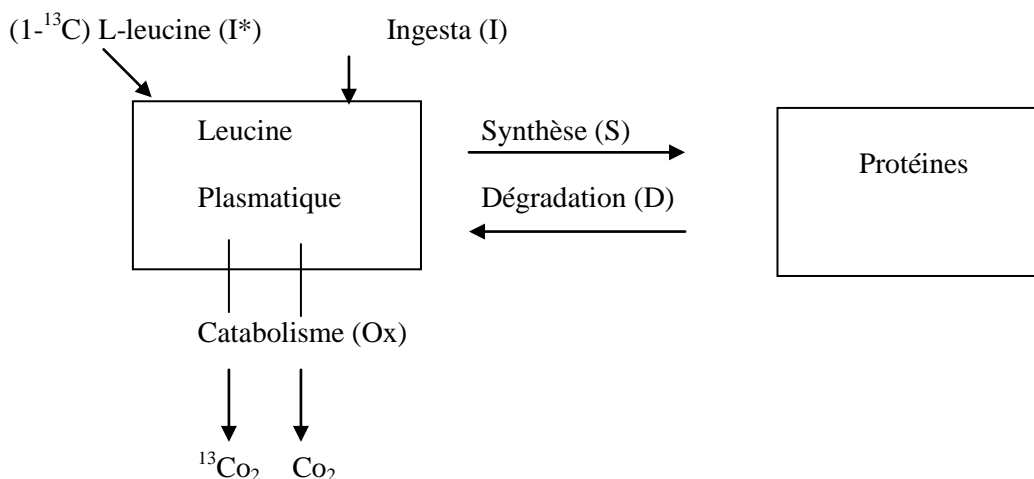
$$\frac{\text{Débit de production de Leu (Ra)}}{\text{Débit de perfusion du traceur}} = \frac{[\text{Leucine}]}{[^{13}\text{C leucine}]}$$

$$\text{donc Débit de production de Leu (Ra)} = \frac{\text{Débit de perfusion du traceur}}{([^{13}\text{C leucine}]/[\text{leucine}])}$$

Débit de production de Leu (Ra) = Débit d'utilisation (Rd) = Débit de renouvellement ou turn-over (Q)

Ra = D + I (Index de dégradation)

Rd = S + Ox (Index de synthèse)



Calcul des paramètres du métabolisme protéique corps entier :

Le calcul de la synthèse protéique sera réalisé à partir d'équations spécifiques prenant en compte l'enrichissement en ^{13}C -leucine ou en ^{13}C -KIC (α -cétosocaproate) libres dans le plasma. Les mesures de production de CO_2 et d'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$ de l'air expiré permettront également de calculer la part de leucine oxydée.

Les différents flux de leucine mesurés peuvent être convertis en flux de protéines sur la base d'un contenu moyen de la leucine dans les protéines totales de l'organisme, ils sont exprimés en g/kg de masse maigre /24h.

Vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine :

Celle-ci est mesurée par la détermination au cours du temps de l'incorporation de la ^{13}C -leucine dans l'albumine. Cette mesure reflète la vitesse de synthèse protéique hépatique.

Mise en place des cathéters :

Le jour du test, deux voies veineuses périphériques seront placées sur les deux bras. Une première représentée par un cathéter court (Cathlon 22G) sera installée au niveau du bras gauche pour les prélèvements sanguins. Pour obtenir du sang veineux artériolisé, le sujet devra placer sa main dans une enceinte thermostatée à 60°C , correspondant à une température cutanée de $37\text{--}40^\circ\text{C}$, pendant 10 min

avant chaque prélèvement. La perméabilité de cette voie sera assurée par une perfusion de sérum physiologique. Un deuxième cathéter court (Cathlon 22G) sera installé au niveau du bras controlatéral pour la perfusion du traceur.

Perfusion du traceur :

Pendant toute la durée de l'étude, la L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) sera perfusée par voie intraveineuse à un débit de $0,10\ \mu\text{mol.kg}^{-1}\text{MM.min}^{-1}$ après une injection d'une dose de charge de L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) et de bicarbonate ^{13}C . Cette dose de charge est utilisée afin d'accélérer l'obtention d'un plateau isotopique dans le plasma, nécessaire à la réalisation des calculs (équations stables). Cette technique permet de réduire le temps de perfusion du traceur. La L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) présente l'avantage de mesurer conjointement le débit d'apparition des acides aminés, l'oxydation de la leucine et d'en déduire la synthèse ainsi que le bilan protéique. Cependant, après l'ingestion d'un repas, le débit d'apparition des acides aminés est composé de deux flux : le flux d'apparition des acides aminés issus de l'alimentation et le flux des acides aminés issus de la protéolyse. La seule perfusion intraveineuse de la L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) ne permet pas de caractériser l'importance relative de ces deux composantes. Pour déterminer le débit d'assimilation des acides aminés des protéines alimentaires, afin également de mesurer leur extraction splanchnique et pour en déduire la protéolyse, il est nécessaire d'ajouter un traceur oral au repas. Ainsi, afin de suivre spécifiquement l'assimilation des protéines ingérées, de la L-leucine ($5,5,5\text{-D}_3$) sera additionnée aux différents régimes de façon à obtenir un débit de traceur par voie orale correspondant à $0,10\ \mu\text{mol.kg}^{-1}\text{MM.min}^{-1}$. Le repas liquide sera constitué de protéines (Protifar), maltodextrines, huile iso-4, arôme caramel ou vanille, sucre.

Prélèvements sanguins :

Le jour du protocole, les prélèvements sanguins seront effectués à partir du cathéter prévu à cet effet. Le premier prélèvement sanguin de la journée permettra de mesurer l'enrichissement isotopique naturel en ^{13}C et en $^2\text{H}_3$ des protéines plasmatiques. Les suivants seront destinés à mesurer l'évolution au cours du temps des enrichissements isotopiques en ^{13}C et en $^2\text{H}_3$ de la leucine libre plasmatique et du α -cétoisocaproate (α -KIC, métabolite de l'oxydation de la leucine).

Afin de déterminer l'enrichissement en L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) des échantillons de 4,5 ml de sang sont recueillis sur tubes héparinés au temps suivant après le début de perfusion de la L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) H0 (basal), 1h30, 1h45, 2h, 2h15, 2h30, 5h30, 5h45, 6h00, 6h15, 6h30.

Mesure de la production de CO_2 et prélèvements des gaz expirés :

Les mesures de volume de CO_2 expiré seront effectuées au moyen d'un calorimètre indirect (Deltatrac, Datex, Genève, Suisse) sous canopy. A la fin des mesures, les patients devront souffler dans un tube sec vacutainer de 15 ml à l'aide d'une paille, afin de mesurer l'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$ de l'air expiré. Le tube est immédiatement bouché et conservé à -4°C . Les mesures de la production de CO_2 et de l'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$ permettront de calculer un des paramètres du métabolisme protéique : l'oxydation de la leucine.

9-3- Préparation des solutions isotopiques

La préparation des solutions isotopiques est sous la responsabilité du pharmacien chef de l'hôpital Henri-Mondor. Les matières premières L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) et L-leucine ($5,5,5\text{-D}_3$) sont achetées chez Eurisotop (Parc des algorithmes, Bâtiment Homère, Route de l'Orme, 91194 Saint Aubin Cédex Tél : 0169419798) qui fournit les procédés de synthèse et les certificats d'analyse. La vérification de la pureté chimique et isotopique des traceurs est effectuée par le fabricant sur chaque lot par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, Hewlett-Packard 5971A, Palo-Alto, CA, USA). Si nécessaire des essais complémentaires sont réalisés pour rendre la matière première conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne (4^{ème} édition, 2001). Ceci permettra la rédaction par le pharmacien responsable du certificat de conformité de la matière première. Les solutions injectables de traceur seront préparées et conditionnées sous la forme de flacons sertis au sein de la PUI de l'hôpital Henri-Mondor dans le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication. Les préparations isotopiques de L-leucine injectable L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) et buvable L-leucine ($5,5,5\text{-D}_3$) seront fabriquées en deux lots (un pour chacune des voies d'administration) conservés à la pharmacie de l'hôpital Henri-Mondor. L'apyrogénicité, la toxicité anormale et la stérilité des solutions finales seront testées. Un certificat de la conformité des différents traceurs sera délivré, conformément à la Pharmacopée Européenne. Ces préparations seront délivrées au Centre d'Investigation Clinique de l'hôpital Henri-Mondor la veille de chaque essai sur prescription

magistrale du médecin du CIC Henri-Mondor. Au cours de la perfusion, les solutions de traceurs seront continuellement filtrées au travers d'un filtre millipore de 0,22 µm avant d'être injectées.

9-4- Etiquetage des échantillons prélevés

Les tubes de plasma seront identifiés par une étiquette portant les mentions suivantes : CIPROAGE, numéro de randomisation (sujet N° 1 à 30), identité du sujet (première lettre du nom – première lettre du prénom, année de naissance), DATE, J..., H..... (= horaire du prélèvement), nature du dosage.

9-5- Contrôle, conditionnement des échantillons prélevés

Après congélation, si nécessaire, les tubes à analyser seront vérifiés un par un, puis conditionnés dans des sachets étiquetés par sujet et par période, puis transmis au centre de dosage en présence d'une feuille de suivi. Celle-ci porte différentes indications ; le nombre de tubes, l'analyse à réaliser, le lieu de l'analyse, la date de prélèvement et l'heure, l'heure de congélation et la température de conservation, la date et heure d'envoi et un bulletin pour accuser réception. Les conditions de transport seront fonction de la température de conservation d'échantillon (température ambiante, + 4° C boîte isotherme, -20°C ou - 80° C carboglace).

9-6- Transport et lieu de réalisation des échantillons prélevés

Inclusion

- CRP, créatininémie, glycémie, albuminémie; le prélèvement est réalisé à jeûn (4,5 ml sur un tube sec) pas de transport ; les examens sont réalisés par le laboratoire de biologie dépendant du centre d'inclusion qui a inclus le patient (Hôpitaux Emile-Roux, Bichat Claude-Bernard, Raymond-Poincaré, Charles-Foix) et par le laboratoire de biologie de l'hôpital Henri-Mondor pour les patients de l'Hôpital Albert-Chenevier qui ne dispose pas de laboratoire.

J1, J21

- Albuminémie, transthyrétinémie, CRP, créatininémie, glycémie : le prélèvement est réalisé à jeûn (4,5 ml sur un tube sec) ; les échantillons sont centrifugés, décantés, étiquetés et aliquotés, le transport est effectué, le jour même à + 4°C, par le coursier de l'hôpital jusqu'au laboratoire de biologie de l'hôpital Emile-Roux (responsable Dr Christian Aussel).

-Acides aminés plasmatiques : les tubes de prélèvements seront piqués dans la glace en attendant la centrifugation qui sera réalisée dans le ¼ d'heure suivant. Après centrifugation à +4° C, le plasma obtenu sera déprotéiné en présence d'acide sulfosalicylique à 30 %, puis centrifugé à +4°C. Le surnageant est décanté et congelé à - 80°C. Le transport est effectué par le coursier de l'hôpital jusqu'au laboratoire de biochimie de l'hôpital Hôtel-Dieu, (Responsable, Pr Luc Cynober). Le dosage plasmatique des acides aminés est réalisé par chromatographie échangeuse de cations sur un analyseur d'acides aminés (Jéol, Tokyo, Japon).

- IGF1, insulínémie : le prélèvement est réalisé à jeûn (4,5 ml sur tube sec) ; les échantillons sont centrifugés à +4°C, décantés, étiquetés et aliquotés, puis congelé à -20°C. Le transport est effectué par le coursier de l'hôpital jusqu'au laboratoire de biochimie de l'hôpital Robert-Debré (responsable, Pr Dominique Porquet).

J21

- Echantillons pour la mesure du turn-over protéique et la synthèse fractionnaire d'albumine : Les tubes de prélèvements seront piqués dans la glace en attendant la centrifugation qui sera réalisée dans le ¼ d'heure suivant. Après centrifugation à 200 G pendant 10 mn à +4° C, le plasma est déquanté, aliquoté en 4 fractions de 400 µl et congelé à - 80°C. Le centre responsable pour ces dosages est le laboratoire de Nutrition Humaine UR 358 INRA, Clermont-Ferrand (responsable, Pr Yves Boirie). Pour le transport les échantillons sont regroupés par 5 patients et adressés, congelés dans la carboglace, par transporteur indépendant.

9-7- Réception des échantillons

A réception des échantillons, un accusé de réception sera envoyé à l'URC par une personne responsable des dosages.

9-8- Volumes sanguin prélevés

Pour chaque sujet, les volumes de sang prélevés maximaux au cours de cette étude devraient être de :

CRP, créatininémie, glycémie, Albuminémie, transthyrétinémie	4,5 ml (J1)	+ 4,5 ml (J21)	9 ml
IGF1, insulínémie	4,5 ml (J1)	+ 4,5 ml (J21)	9 ml
Acides aminés plasmatiques	2 ml (J1)	+ 2 ml x 5 (J21)	12 ml
Mesure dilution isotopique L-leucine (1- ¹³ C)		4,5 ml x 10 (J21)	45 ml
Albumine (synthèse fractionnaire)		2 ml x 7 (J21)	14 ml
		Total	= 89 ml

10- EVALUATION DE LA SECURITE

10-1- Description des paramètres d'évaluation de la sécurité

- **Evénement indésirable**

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche.

- **Effet indésirable du produit expérimental**

Toute réaction nocive et non désirée à un produit expérimental quelle que soit la dose administrée

- **Evénement ou effet indésirable grave**

Tout événement ou effet indésirable qui entraîne la mort, met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche, nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation, provoque une incapacité ou un handicap importants ou durables, ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale, et s'agissant du médicament, quelle que soit la dose administrée.

- **Effet indésirable inattendu d'un médicament expérimental**

Tout effet indésirable dont la nature, la sévérité ou l'évolution ne concorde pas avec les informations figurant dans le résumé des caractéristiques du produit lorsque le médicament est autorisé, et dans la brochure pour l'investigateur lorsqu'il n'est pas autorisé.

- **Fait nouveau**

Toute nouvelle donnée de sécurité, pouvant conduire à une réévaluation du rapport des bénéfices et des risques de la recherche ou du médicament expérimental, ou qui pourrait être suffisant pour envisager des modifications dans l'administration du médicament expérimental, dans la conduite de la recherche.

10-2- Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de la sécurité

Comités spécifiques de la recherche

10-2-1- Comité de pilotage

Il sera constitué de l'investigateur coordonnateur (Pr Melchior) et des investigateurs initiateurs cliniciens du projet (Dr Crenn, Dr Bouillanne, Dr Paillaud, Dr Raynaud-Simon, Dr Meaume), du biostatisticien (Dr Cunin) en charge du projet, des représentants du promoteur (Dr Chassany) et de l'URC (Dr Maison) nommés pour cette recherche.

Il définira l'organisation générale et le déroulement de la recherche et coordonnera les informations.

Comité d'évaluation des événements critiques

Il déterminera initialement la méthodologie et décidera en cours de recherche des conduites à tenir dans les cas imprévus, surveillera le déroulement de la recherche en particulier sur le plan de la tolérance et des événements indésirables.

10-3- Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables

10-3-1- Evénements indésirables non graves

Tout événement indésirable - non grave suivant la définition précédente - observé lors de la recherche et dans ses suites devra être reporté dans le cahier d'observation dans la section prévue à cet effet.

Un seul événement doit être reporté par item. L'événement peut correspondre à un symptôme, un diagnostic ou à un résultat d'examen complémentaire jugé significatif. Tous les éléments cliniques ou para-cliniques permettant de décrire au mieux l'événement correspondant doivent être reportés.

10-3-2- Evénements indésirables graves (EIG) :

Le formulaire de déclaration d'EIG prévu est en annexe du protocole.

Les investigateurs doivent notifier immédiatement au promoteur AP-HP les événements indésirables graves tels que définis ci-dessus.

L'investigateur complète les formulaires d'événements indésirables graves (du cahier d'observation de la recherche) et les envoie au DRCD par fax au 01 44 84 17 99 et ce, dans les 48 heures (après si possible un appel téléphonique immédiat au 01 44 84 17 23 en cas de décès ou d'une menace vitale).

L'investigateur doit également informer l'URC en charge de la recherche de la survenue de l'EIG.

Pour chaque événement indésirable grave, l'investigateur devra émettre un avis sur le lien de causalité de l'événement avec chaque ADFMS et les autres traitements éventuels.

L'obtention d'informations relatives à la description et l'évaluation d'un événement indésirable peuvent ne pas être possibles dans le temps imparti pour la déclaration initiale.

Aussi, l'évolution clinique ainsi que les résultats des éventuels bilans cliniques et des examens diagnostiques et/ou de laboratoire, ou toute autre information permettant une analyse adéquate du lien de causalité seront rapportés :

- soit sur la déclaration initiale d'EIG s'ils sont immédiatement disponibles,
- soit ultérieurement et le plus rapidement possible, en envoyant par fax une nouvelle déclaration d'EIG complétée (et en précisant qu'il s'agit d'un suivi d'EIG déclaré et le numéro de suivi).

Toutes les déclarations faites par les investigateurs devront identifier chaque sujet participant à la recherche par un numéro de code unique attribué à chacun d'entre eux.

En cas de décès notifié d'un sujet participant à la recherche, l'investigateur communiquera au promoteur tous les renseignements complémentaires demandés (compte-rendu d'hospitalisation, résultats d'autopsie...).

Tout fait nouveau survenu dans la recherche ou dans le contexte de la recherche, provenant de données de la littérature ou de recherches en cours, devra être notifié au promoteur.

10-3-3- Déclaration des événements indésirables graves aux Autorités de Santé

Elle sera assurée par le Pôle de Pharmacovigilance du DRCD, après évaluation de la gravité de l'événement indésirable, du lien de causalité avec chaque ADFMS et les autres produits non expérimentaux éventuels ainsi que du caractère inattendu des effets indésirables.

Toutes les suspicions d'effet indésirable grave inattendu seront déclarées par le promoteur aux autorités compétentes dans les délais légaux.

Toute donnée de sécurité ou tout fait nouveau qui pourrait modifier significativement l'évaluation du rapport des bénéfices et des risques d'un ADFMS, ou de la recherche, ou qui pourrait conduire à envisager des modifications concernant l'administration de l'ADFMS ou la conduite de la recherche, sera transmise par le promoteur aux autorités compétentes, au Comité de Protection des Personnes et aux investigateurs de la recherche. Par exemple :

- a) toute augmentation cliniquement significative de la fréquence d'apparition d'un effet indésirable grave attendu ;
- b) des suspicions d'effet indésirable grave inattendu survenus chez des participants ayant terminé l'essai et qui sont notifiés par l'investigateur au promoteur, ainsi que des rapports de suivi éventuels ;
- c) tout fait nouveau concernant le déroulement de l'essai clinique ou le développement de l'ADFMS, lorsque ce fait nouveau est susceptible de porter atteinte à la sécurité des participants. A titre d'exemple :
 - un événement indésirable grave susceptible d'être lié aux investigations et aux procédures de diagnostic de l'essai et qui pourrait modifier le déroulement de cet essai,
 - un risque significatif pour la population de l'essai comme par exemple un manque d'efficacité du médicament utilisé dans le traitement d'une maladie mettant en jeu le pronostic vital,
 - des résultats significatifs de sécurité issus d'une étude menée chez l'animal récemment terminée (telle qu'une étude de carcinogénicité),
 - un arrêt anticipé ou une interruption temporaire pour des raisons de sécurité d'un essai conduit avec le même médicament dans un autre pays,
 - un effet indésirable grave inattendu lié à un médicament non expérimental nécessaire à la réalisation de l'essai (ex : « challenge agents », traitement de secours)
- d) les recommandations du comité de surveillance indépendant [Data Monitoring Committee (DMC) ou Data Safety Monitoring Board (DSMB)], le cas échéant, si elles sont pertinentes pour la sécurité des personnes,
- e) tout effet indésirable grave inattendu transmis au promoteur par un autre promoteur d'un essai clinique mené dans un pays tiers portant sur le même médicament.

10-4- Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'événements indésirables

Tout patient présentant un événement indésirable doit être suivi jusqu'à la résolution ou la stabilisation de celui-ci.

Si l'événement n'est pas grave, l'évolution en sera notée sur la page correspondante du cahier d'observation à la section prévue à cet effet.

Si l'événement est grave, un suivi d'EIG sera envoyé au DRCD.

11- ANALYSES STATISTIQUES

11-1- Nombre de sujets nécessaires

L'intervention sera jugée comme étant efficace si une différence d'évolution de la synthèse protéique mesurée par la L-leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}$) est observée entre les deux groupes. Cette différence sera considérée comme étant cliniquement intéressante si elle est au moins égale à 0,8 g de protéines synthétisées/kg de masse maigre/jour après au moins trois semaines d'inclusion. Le nombre de sujets par groupe est donné par la formule :

$$n = 2 \frac{\sigma^2}{\Delta^2} (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2$$

Avec σ l'écart type (ici 0,5 de protéines/kg de masse maigre /jour), Δ la différence à mettre en évidence (0,8), un test bilatéral avec un risque de première espèce $\alpha = 0,05$, une puissance de 95% et donc un risque de 2^{ème} espèce $\hat{\alpha} = 0,05$. Le nombre est de 10,2 sujets par groupe arrondi à 11. Compte tenu de la possibilité de perdus de vue ou de sorties de protocole, qui à cet âge de la vie est plus important que chez les sujets adultes jeunes, et de dossiers non exploitables il semble nécessaire d'inclure 15 sujets par groupe soit 30 sujets au total.

11-2- Evaluation de l'efficacité de l'intervention et plan d'analyse

Analyse descriptive : la population sera décrite pour les variables socio démographiques (âge, sexe), les paramètres cliniques (poids, IMC, etc.) et biologiques à J1. L'activité physique sera évaluée entre J1 et J21 pour les deux groupes. Une comparaison sera effectuée entre les 2 groupes traités et contrôle, un test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives, un test du χ^2 ou un test exact de Fisher pour les variables qualitatives. Une comparaison sera également effectuée entre les centres pour ces variables.

Evaluation de l'efficacité de l'intervention :

Le critère principal de jugement est le flux de synthèse protéique corps entier à l'état post absorptif. Les groupes traités et les groupes témoin seront comparés avec un test de Mann-Whitney.

Les résultats seront analysés en intention de traiter et en per-protocole.

Les critères secondaires de jugement sont:

- à l'état post-absorptif : le turn-over protéique, le flux de dégradation des protéines, l'oxydation, le flux de synthèse des protéines, la vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine.
- à l'état post-prandial: le turn-over protéique, le flux de dégradation des protéines, l'oxydation, le flux de synthèse des protéines la séquestration splanchnique de la leucine et la vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine.
- Les critères principaux et secondaires du groupe traité et du groupe témoin seront comparés avec un test de Mann-Whitney.

Les variations relatives entre J1 et J21 des caractéristiques cliniques et biologiques seront également comparées entre les deux groupes: poids, IMC, Masse maigre, échelle visuelle analogique de l'appétit, créatininémie, albuminémie, transthyrétinémie, glycémie, CRP, insulinémie, IgF-1 plasmatique, aminoacidogramme plasmatique.

Si lors de l'analyse descriptive des différences ont été trouvées entre les groupes traité et contrôle, ou entre les centres, pour certaines variables, il faudra en tenir compte à ce niveau et pratiquer une analyse multivariée de type General Linear Model (GLM) en incluant ces variables dans le modèle.

12- DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

Les personnes ayant un accès direct conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur, notamment les articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique (par exemple, les investigateurs, les personnes chargées du contrôle de qualité, les moniteurs, les assistants de recherche clinique, les auditeurs et toutes personnes appelées à collaborer aux essais) prennent toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Les données collectées par ces personnes au cours des contrôles de qualité ou des audits sont alors rendues anonymes.

13- CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE

La recherche sera encadrée selon les procédures opératoires standards du promoteur.

Le déroulement de la recherche dans les centres investigateurs et la prise en charge des sujets sera fait conformément à la déclaration d'Helsinki et les Bonnes Pratiques en vigueur.

Pendant toute la durée de l'étude, des visites et des contacts téléphoniques réguliers seront assurés par l'ARC afin d'aider à compléter les dossiers, s'assurer du bon recueil des données, vérifier l'existence de l'étude multicentrique CIPROAGE version n° 2.1 du 09/02/2009

consentement des sujets et le respect des bonnes pratiques cliniques, contrôler le bon usage des produits à l'essai et leur condition de stockage et de conservation.

13-1- Procédures de monitoring

L'ARC représentant du promoteur effectuera des visites des centres investigateurs au rythme correspondant au schéma de suivi des patients dans le protocole, aux inclusions dans les différents centres et conformément au risque B qui a été attribué à la recherche.

Visite d'ouverture de chaque centre : avant inclusion, pour une mise en place du protocole et prise de contact avec les différents intervenants de la recherche biomédicale.

Lors des visites suivantes, les cahiers d'observation seront revus au fur et à mesure de l'état d'avancement de la recherche par l'ARC. L'investigateur principal de chaque centre ainsi que les autres investigateurs qui incluent ou assurent le suivi des personnes participant à la recherche s'engagent à recevoir l'ARC à intervalles réguliers.

Lors de ces visites sur site et en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques, les éléments suivants seront revus :

- Respect du protocole et des procédures définies pour la recherche,
- Vérification des consentements éclairés des patients
- Examen des documents source et confrontation avec les données reportées dans le cahier d'observation quant à l'exactitude, les données manquantes, la cohérence des données selon les règles édictées par les procédures du DRCD.

Visite de fermeture : récupération des cahiers d'observation, bilan à la pharmacie, documents de la recherche biomédicale, archivage.

13-2- Transcription des données dans le cahier d'observation

Toutes les informations requises par le protocole doivent être fournies dans le cahier d'observation et une explication donnée par l'investigateur pour chaque donnée manquante.

Un cahier d'observation (CRF) sera fourni par l'URC pour chaque sujet. Toutes les données cliniques et biologiques nécessaires à l'étude seront retranscrites par l'investigateur dans le CRF de chaque sujet. Chaque sujet y sera identifié par le numéro du centre investigateur, son numéro d'inclusion (= n° randomisation), ses initiales et son année de naissance. Les données devront être copiées de façon nette et lisible à l'encre noire dans ces cahiers (ceci afin de faciliter la duplication et la saisie informatique). Les CRF seront remplis de manière indélébile ; les corrections nécessaires devront être motivées et authentifiées et la première inscription devra rester lisible. Les données erronées dépistées sur les cahiers d'observation seront clairement barrées et les nouvelles données seront copiées sur le cahier avec les initiales et la date par le membre de l'équipe de l'investigateur qui aura fait la correction.

Les CRF seront remplis sous la responsabilité de l'investigateur principal et des co-investigateurs qui devront veiller à l'exactitude des données saisies.

Si l'investigateur autorise une autre personne à compléter les cahiers d'observation, le nom, titre et signature devront être transmis au promoteur.

Si une information ne peut être renseignée, elle sera identifiée selon le cas approprié :

- UN (Unknown) doit être utilisé lorsque l'information existe mais ne peut être renseignée.
- NA (Not Applicable) doit être utilisé lorsqu'une information prévue d'être renseignée ne peut l'être pour une raison univoque.
- ND (Not Done) doit être utilisé lorsqu'une information prévue et pouvant logiquement être renseignée ne peut l'être pour une raison intercurrente.
- TP (Technical Problem) doit être utilisé lorsqu'une information résultant d'une manipulation technique n'a pu être correctement évaluée.

Le CRF rempli doit être signé par l'investigateur et les dossiers cliniques correspondant à ces cahiers d'observation doivent être archivés quinze ans

L'anonymat des sujets sera assuré par le numéro de randomisation, les initiales et l'année de naissance de la personne qui se prête à la recherche sur tous les documents nécessaires à la recherche, ou par effacement par les moyens appropriés des données nominatives sur les copies des documents source, destinés à la documentation de la recherche.

Les données informatisées sur un fichier seront déclarées à la CNIL selon la procédure adaptée au cas.

13-3- Data Management

Après l'étape du monitoring, les cahiers d'observation sont transmis au service de Data Management de l'URC. A partir de cette étape, les CRF ne sont plus modifiés et les modifications sont tracées sur des demandes de clarification.

Une double saisie sera réalisée avec un logiciel de base de données (ACCESS). La saisie de ces données sera vérifiée automatiquement par des procédures de validation incluse lors de la programmation du masque de saisie de la base de données, une deuxième vérification sera réalisée par comparaison des deux saisies puis enfin une vérification plus fine sera réalisée avant l'analyse statistique. En cas d'erreur, de doute ou d'incohérence, les données seront vérifiées, puis éventuellement corrigées et validées à l'aide du dossier médical. Une fois validée, les données sont gelées afin d'empêcher toute modification. Ces données seront gérées par l'Unité de Recherche Clinique de Créteil et leur enregistrement sera protégé. L'analyse statistique des données sera réalisée par l'Unité de Recherche Clinique de Créteil.

13-4- Audit

A tout moment, un audit des dossiers relatifs à l'essai pourra être effectué, indépendamment des visites de suivi par des auditeurs externes.

14- ASPECTS LEGAUX, ETHIQUES ET ADMINISTRATIFS

Loi de santé publique du 6 août 2004 (articles L1121 à 1126-7 et décret n° 2006-477 du 26/4/2006).

Le promoteur est défini par la loi 2004-806 du 9 août 2004. Dans cette recherche, l'AP-HP est le promoteur et le Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD) en assure les missions réglementaires.

Avant de démarrer la recherche, chaque investigateur fournira au représentant du promoteur de la recherche une copie de son curriculum vitae personnel daté et signé et comportant son numéro d'inscription à l'ordre des médecins et son numéro ADELI.

14-1- Demande d'autorisation auprès de la DGS

Pour pouvoir démarrer la recherche, l'AP-HP en tant que promoteur doit soumettre un dossier de demande d'autorisation auprès de l'autorité compétente la DGS. L'autorité compétente, définie à l'article L. 1123-12, se prononce au regard de la sécurité des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale, en considérant notamment la sécurité et la qualité des produits utilisés au cours de la recherche conformément, le cas échéant, aux référentiels en vigueur, leur condition d'utilisation et la sécurité des personnes au regard des actes pratiqués et des méthodes utilisées ainsi que les modalités prévues pour le suivi des personnes.

14-2- Demande d'avis au Comité de Protection des Personnes

En accord avec l'article L.1123-6 du Code de Santé Publique, le protocole de recherche sera soumis par le promoteur au Comité de Protection des Personnes Ile de France XI (20 rue Armages, 78105 Saint Germain en Laye). L'avis de ce comité est notifié à l'autorité compétente par le promoteur avant le démarrage de la recherche.

14-3- Modifications

Le DRCD doit être informé de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur.

Les modifications devront être qualifiées en substantielles ou non.

Une modification substantielle est une modification susceptible, d'une manière ou d'une autre, de modifier les garanties apportées aux personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale (modification d'un critère d'inclusion, prolongation d'une durée d'inclusion, participation de nouveaux centres,...).

Après le commencement de la recherche, toute modification substantielle de celle-ci à l'initiative du promoteur doit obtenir, préalablement à sa mise en oeuvre, un avis favorable du comité et une

autorisation de l'autorité compétente. Dans ce cas, si cela est nécessaire, le comité s'assure qu'un nouveau consentement des personnes participant à la recherche est bien recueilli.

Par ailleurs, toute extension de la recherche (modification profonde du schéma thérapeutique ou des populations incluses, prolongation des traitements et ou des actes thérapeutiques non prévus initialement dans le protocole) devra être considérée comme une nouvelle recherche.

Toute modification substantielle devra faire l'objet par le promoteur après paiement d'une taxe d'une demande d'autorisation auprès de la DGS et/ou d'une demande d'avis du CPP.

14-4- Secret professionnel et anonymat

Selon l'article R.5120 du Code de la Santé Publique, toutes les personnes participant à la réalisation de cet essai seront soumises au secret professionnel. Cependant, afin de préserver l'anonymat des sujets, chacun sera identifié par les trois premières lettres de son nom, les deux premières lettres de son prénom et par l'attribution d'un numéro de traitement à l'inclusion dans l'essai. Le traitement des données sera effectué conformément à la Loi « Informatique et Libertés » n° 2004-801 du 6 août 2004, modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978

14-5-Déclaration CNIL

La loi prévoit que la déclaration du fichier informatisé des données personnelles collectées pour la recherche doit être faite avant le début effectif de la recherche.

Une méthodologie de référence spécifique au traitement de données personnelles opérée dans le cadre des recherches biomédicales définies par la loi 2004-806 du 9 août 2004 car entrant dans le champ des articles L.1121-1 et suivants du Code de Santé Publique a été établie par la CNIL en janvier 2006.

Cette méthodologie permet une procédure de déclaration simplifiée lorsque la nature des données recueillies dans la recherche est compatible avec la liste prévue par la CNIL dans son document de référence.

Lorsque le protocole bénéficie d'un contrôle qualité des données par un ARC représentant le promoteur et qu'il entre dans le champ d'application de la procédure simplifiée CNIL, le DRCD en qualité de promoteur demandera au responsable du fichier informatique de s'engager par écrit sur le respect de la méthodologie de référence MR06001 simplifiée.

14-6- Note d'information et consentement éclairé

Le consentement écrit doit être recueilli auprès de toute personne se prêtant à la recherche avant la réalisation de tout acte nécessité par la recherche biomédicale.

Une note d'information écrite sera remise au sujet. Elle comportera les renseignements sur l'objectif de la recherche, sa méthodologie, sa durée, les contraintes et les risques prévisibles liés soit à la recherche soit au traitement proposé, ainsi que le droit du sujet de refuser de participer à cette recherche ou de retirer son consentement à tout moment sans endosser aucune responsabilité.

L'investigateur informera chaque sujet sur les conditions de la recherche, le but poursuivi et les contraintes prévisibles, puis recueillera par écrit son consentement libre et éclairé. Un exemplaire du formulaire de consentement sera conservé par l'investigateur ; un autre sera donné au sujet ; un troisième exemplaire sera glissé dans une enveloppe qui sera ensuite scellée avant sa remise au promoteur pour archivage pendant une durée de 15 ans.

14-7- Rapport final de la recherche

Le rapport final de la recherche sera écrit en collaboration par le coordonnateur et le biostatisticien pour cette recherche. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu'un consensus aura été obtenu, la version finale devra être avalisée par la signature de chacun des investigateurs et adressée au promoteur dans les meilleurs délais après la fin effective de la recherche. Un rapport rédigé selon le plan de référence de l'autorité compétente doit être transmis à l'autorité compétente ainsi qu'au CPP dans un délai de un an, après la fin de la recherche, s'entendant comme la dernière visite de suivi du dernier sujet inclus. Ce délai est rapporté à 90 jours en cas d'arrêt prématuré de la recherche.

15-TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents d'une recherche entrant dans le cadre de la loi sur les recherches biomédicales doivent être archivés par toutes les parties pendant une durée de 15 ans après la fin de la recherche.
(voir BPC, chapitre 8 : documents essentiels)

Cet archivage indexé comporte :

- Les copies de courrier d'autorisation de la DGS et de l'avis obligatoire du CPP
- Les versions successives du protocole (identifiées par le n° de version et la date de version),
- Les courriers de correspondance avec le promoteur,
- Les consentements signés des sujets sous pli cacheté (dans le cas de sujets mineurs signés par les titulaires de l'autorité parentale) avec la liste ou registre d'inclusion en correspondance,
- Le cahier d'observation complété et validé de chaque sujet inclus,
- Toutes les annexes spécifiques à l'étude,
- Le rapport final de l'étude provenant de l'analyse statistique et du contrôle qualité de l'étude (double transmis au promoteur).
- Les certificats d'audit éventuels réalisés au cours de la recherche

La base de données ayant donné lieu à l'analyse statistique doit aussi faire l'objet d'archivage par le responsable de l'analyse (support papier ou informatique).

16- ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE

16-1- Assurance

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris est le promoteur de cette recherche. En accord avec la loi sur les recherches biomédicales, elle a pris une assurance auprès de la compagnie GERLING KONZERN pour toute la durée de la recherche, garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant (médecin ou personnel impliqué dans la réalisation de la recherche) (loi n°2004-806, Art L.1121-10 du CSP).

L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons médicales ou administratives; dans cette éventualité, une notification sera fournie à l'investigateur.

16-2-Engagement scientifique

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations de la loi et à mener la recherche selon les B.P.C., en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki en vigueur. Pour ce faire, un exemplaire de l'engagement scientifique (document type DRCD) daté et signé par chaque investigateur de chaque service clinique d'un centre participant sera remis au représentant du promoteur.

17- REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable. Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats.

Par précaution, un comité d'écriture devrait être constitué et l'ordre des signataires pourra être défini par avance.

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris doit être mentionnée comme étant le promoteur de la recherche biomédicale et comme soutien financier le cas échéant. Les termes « Assistance Publique-Hôpitaux de Paris » doivent apparaître dans l'adresse des auteurs.

18- DOCUMENTS FOURNIS EN ANNEXES

ANNEXE 1 : Mini Nutritional Assessment (MNA)

ANNEXE 2 : Score Mini Mental Status de FOLSTEIN (MMS)

ANNEXE 3 : Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI),

ANNEXE 4 : Fiche d'observation alimentaire

ANNEXE 5 : Tolérance clinique

ANNEXE 6 : Certificat d'alimentarité pour les ADFMS

ANNEXE 7 : Formulaire de déclaration d'un EIG

19- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hebuterne X, Broussard JF, Rampal P. Acute renutrition by cyclic enteral nutrition in elderly and younger patients. *JAMA* 1995; 273:638-643.
- [2] Boirie Y, Gachon P, Beaufrère B. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 1997;65:489-495
- [3] Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY et al. Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol* 1995; 268:E328-E335.
- [4] Cynober L, Jourdan M, Aussel C, Guillet C, Walrand S, Boirie Y. Sarcopénie des sujets âgés : libérez les acides aminés ! *Nutr Clin Metabol* 2004; 18:198-204.
- [5] Cynober L, Marcollet M. Métabolisme des protéines. *Encycl Med Chir* 1994; 375:A10-A22.
- [6] Cynober L, Le Boucher J, Vasson MP. Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1995; 6:402-413.
- [7] Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2000;29:177-205
- [8] Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* 1981; 241:E473-E480.
- [9] Osowska S., Moinard C, Neveux N, Loï C, Cynober L. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut* 2004; 53:1781-1786.
- [10] Osowska S., Duchemann T., Walrand S., Paillard, A, Boirie, Y., Cynober, L., and Moinard C. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E582-E586.
- [11] Wakabayashi Y. The glutamate crossway. In: Cynober L, editor. *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2004: 135-152.
- [12] Fornaris E, Vanuxem D, Duflot J, Bernasconi P, Grimaud C. Approche pharmacocinétique de l'activité du malade de citrulline : étude des taux de lactates sanguins lors d'un exercice musculaire standardisé. *Gaz Méd* 1984; 91:125-127.
- [13] Castillo L, Chapman TE, Sanchez M, Yu YM, Burke JF, Ajami AM et al. Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7749-7753.
- [14] Moinard C, Nicolis I, Neveux N, Darquy S, Benazeth S, Cynober L. Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the citrodose pharmacokinetic study. *Brit J Nutr* 2007 (sous presse).
- [15] Bouillanne O, Morineau G, Dupont C, Coulombel I, Vincent JP, Nicolis I, Benazeth S, Cynober L, Aussel C. Geriatric Nutritional Risk Index : a new index for evaluating at-risk elderly medical patients. *Am J Clin Nutr* 2005;82:777-83.
- [16] Cynober L. Les pharmaconutriments azotés : du tube à essai à la pratique clinique. *Cah Nutr Diét* 2001;34:273-284: a new index for evaluating at-risk elderly medical patients. *Am J Clin Nutr* 2005;82:777-83.
- [17] Kyle US, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gomez JM, Lilienthal L, Heitmann B, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, Schols A, Pichard C. Bioelectrical impedance analysis-part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 2004;23:1226-1243.

ANNEXE 1

Mini Nutritional Assessment (MNA)

Nom :	Prénom :	Sexe :	Date :/...../.....
Age :	Poids, kg :	Taille (cm) :	Hauteur genou (cm) :

Répondez à la première partie du questionnaire en indiquant le score approprié pour chaque question. Additionnez les points de la partie. Dépistage, si le résultat est égal à 11 ou inférieur, complétez le questionnaire pour obtenir l'appréciation précise de l'état nutritionnel.

Dépistage	
A Le patient présente-t-il une perte d'appétit? A-t-il mangé moins ces 3 derniers mois par manque d'appétit, problèmes digestifs, difficultés de mastication ou de déglutition? 0 = anorexie sévère 1 = anorexie modérée 2 = pas d'anorexie	<input type="checkbox"/>
B Perte récente de poids (<3 mois) 0 = perte de poids > 3 kg 1 = ne sait pas 2 = perte de poids entre 1 et 3 kg 3 = pas de perte de poids	<input type="checkbox"/>
C Motricité 0 = du lit au fauteuil 1 = autonome à l'intérieur 2 = sort du domicile	<input type="checkbox"/>
D Maladie aiguë ou stress psychologique lors des 3 derniers mois? 0 = oui 2 = non	<input type="checkbox"/>
E Problèmes neuropsychologiques 0 = démence ou dépression sévère 1 = démence ou dépression modérée 2 = pas de problème psychologique	<input type="checkbox"/>
F Indice de masse corporelle (IMC = poids / (taille) ² en kg/m ²) 0 = IMC < 19 1 = 19 ≤ IMC < 21 2 = 21 ≤ IMC < 23 3 = IMC ≥ 23	<input type="checkbox"/>
Score de dépistage (sous-total max. 14 points) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
12 points ou plus	normal pas besoin de continuer l'évaluation
11 points ou moins	possibilité de malnutrition – continuez l'évaluation

Evaluation globale	
G Le patient vit-il de façon indépendante à domicile? 0 = non 1 = oui	<input type="checkbox"/>
H Prend plus de 3 médicaments 0 = oui 1 = non	<input type="checkbox"/>
I Escarres ou plaies cutanées? 0 = oui 1 = non	<input type="checkbox"/>

J Combien de véritables repas le patient prend-il par jour? 0 = 1 repas 1 = 2 repas 2 = 3 repas	<input type="checkbox"/>
K Consomme-t-il? • Une fois par jour au moins des produits laitiers? oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> • Une ou deux fois par semaine des œufs ou des légumineuses oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> • Chaque jour de la viande, du poisson ou de la volaille oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> 0,0 = si 0 ou 1 oui 0,5 = si 2 oui 1,0 = si 3 oui	<input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>
L Consomme-t-il deux fois par jour au moins des fruits ou des légumes? 0 = non 1 = oui	<input type="checkbox"/>
M Combien de verres de boissons consomme-t-il par jour? (eau, jus, café, thé, lait, vin, bière...) 0,0 = moins de 3 verres 0,5 = de 3 à 5 verres 1,0 = plus de 5 verres	<input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>
N Manière de se nourrir 0 = nécessite une assistance 1 = se nourrit seul avec difficulté 2 = se nourrit seul sans difficulté	<input type="checkbox"/>
O Le patient se considère-t-il bien nourri? (problèmes nutritionnels) 0 = malnutrition sévère 1 = ne sait pas ou malnutrition modérée 2 = pas de problème de nutrition	<input type="checkbox"/>
P Le patient se sent-il en meilleure ou en moins bonne santé que la plupart des personnes de son âge? 0,0 = moins bonne 0,5 = ne sait pas 1,0 = aussi bonne 2,0 = meilleure	<input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>
Q Circonférence brachiale (CB en cm) 0,0 = CB < 21 0,5 = CB ≤ 21 ≤ 22 1,0 = CB > 22	<input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>
R Circonférence du mollet (CM en cm) 0 = CM < 31 1 = CM ≥ 31	<input type="checkbox"/>
Evaluation globale (max. 16 points)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>
Score de dépistage	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Score total (max. 30 points)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> , <input type="checkbox"/>

Appréciation de l'état nutritionnel

de 17 à 23,5 points	risque de malnutrition	<input type="checkbox"/>
moins de 17 points	mauvais état nutritionnel	<input type="checkbox"/>

ANNEXE 2

Score Mini Mental Status de FOLSTEIN (MMS)

Orientation

/ 10

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire.
Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.
Quelle est la date complète d'aujourd'hui ? _____

Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posées les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

☐
☐
☐
☐
☐

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?*
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?**
9. Dans quelle province ou région est située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

☐
☐
☐
☐
☐

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

- | | | |
|-----|----|--------------------------|
| 14. | 93 | <input type="checkbox"/> |
| 15. | 86 | <input type="checkbox"/> |
| 16. | 79 | <input type="checkbox"/> |
| 17. | 72 | <input type="checkbox"/> |
| 18. | 65 | <input type="checkbox"/> |

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :
Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Langage

/ 8

- | | | |
|---|--------------------------------------|--------------------------|
| Montrer un crayon. | 22. Quel est le nom de cet objet ?* | <input type="checkbox"/> |
| Montrer votre montre. | 23. Quel est le nom de cet objet ?** | <input type="checkbox"/> |
| 24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »*** | | <input type="checkbox"/> |

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :

25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,

26. Pliez-la en deux,

27. Et jetez-la par terre. »****

☐
☐
☐

Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :

28. « Faites ce qui est écrit ».

☐

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :

29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »*****

☐

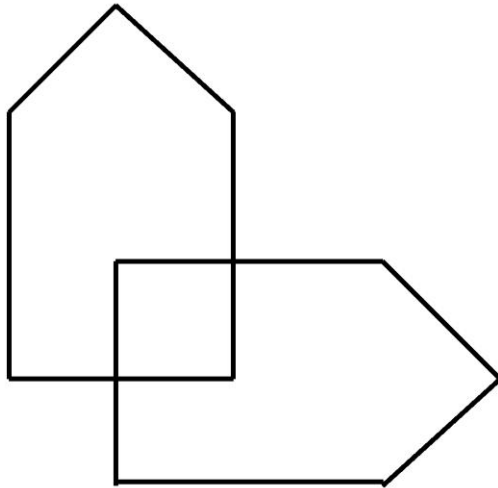
Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander : 30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »

☐

« FERMEZ LES YEUX »



ANNEXE 3

Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI)

$GNRI = (1,489 \times Alb) + 41,7 \text{ (Pds actuel / Pds théorique)}$

Albumine en g/l

Poids en kg

Pds théorique (Pt) selon LORENTZ :

- Homme : $Pt = T - 100 - [(T - 150) / 4]$
avec $T = (2,02 \times HG) - (0,04 \times \text{âge}) + 64,19$

- Femme : $Pt = T - 100 - [(T - 150) / 2,5]$
avec $T = (1,83 \times HG) - (0,24 \times \text{âge}) + 84,88$

Taille (T) en cm

Hauteur du genou (HG) en cm

Mesure : Le patient est assis ou couché. Former un angle de 90 degrés entre la jambe et la cuisse et entre le pied et la jambe. La partie gauche du calibre est placée sous le talon, la partie mobile est placée au-dessus des condyles fémoraux. L'axe du calibre est parallèle à l'axe du tibia et une légère pression est effectuée afin de comprimer les tissus.

Valeurs usuelles :

GNRI > 98 :	Pas de risque
$92 \leq GNRI \leq 98$:	à risque
$82 \leq GNRI < 92$:	risque modérée
GNRI < 82	risque sévère

Références :

Bouillanne O, Morineau G, Dupont C, Coulombel I, Vincent JP, Nicolis I, Benazeth S, Cynober L, Aussel C. Geriatric Nutritional Risk Index : a new index for evaluating at-risk elderly medical patients. Am J Clin Nutr 2005;82:777-83.

Chumlea WC, Roche AF, Steinbaugh ML. Estimating stature from knee height for persons 60 to 90 years of age. J Am Geriatr Soc 1985;33:116-20.

ANNEXE 4

FICHE D'OBSERVATION ALIMENTAIRE

DATE :

CODE

REPAS		MIDI		SOIR	
Composition	Référence	Aliments et Boissons Choisis		Aliments et boissons choisis	
		Quantité servie	Quantité consommée	Quantité servie	Quantité* consommée
Entrée	Part				
Potage	Assiette				
VPO**	Part				
Légumes	Cuillère à soupe				
Fromage	Portion				
Laitage	Unité				
Fruit	Unité				
Compote	Unité				
Entremet	Cuill. à soupe Unité (pot)				
Pâtisserie	Part				
Pain	Unité				
Biscotte	Unité				
Boisson	Verre				
Sucre					
Morceau	Unité				
Poudre	Unité				
AUTRES					

AUTRES APPORTS		QUANTITE*	
Aliments et boissons	Référence	Petit déjeuner	Goûter
Thé ou café	Bol		
Café au lait	Bol		
Chocolat au lait	Bol		
Lait	Bol		
Pain	Unité		
Biscottes	Unité		
Viennoiserie	Unité		
Beurre	Unité		
Confiture	Unité		
Biscuit	Unité		
Compote	Unité		
Bouillie	Bol		
AUTRES			

* Précisez : 0, ¼, ½, 1, 1 ½, 2

** VPO : viande, poisson, œuf

ANNEXE 5

TOLERANCE CLINIQUE

Un événement indésirable représente toute modification clinique de l'état d'un patient constaté au cours ou au décours de l'étude.

Des évènements indésirables ont-ils été rapportés ? ☐ OUI ☐ NON

Si "OUI" remplir le tableau ci-dessous :

Description	Date de survenue J M A	Intensité	Evolution	Si guérison, date de résolution J M A
		1. mineure 2. modérée 3. majeure	1. persistance 2. disparition	
Nausées	:	:
Vomissements	:	:
Reflux gastro- oesophagiens	:	:
Diarrhées	:	:
Constipation	:	:
Douleurs abdominales	:	:
Anorexie	:	:
Autres (précisez)	:	:

ANNEXE 6



KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8185, Japan
Tel: +81-3-3282-0007 Fax: +81-3-3284-1968
<http://www.kyowa.co.jp/>

May 29, 2007

To whom it may concern;

Quality of Kyowa Hakko's Amino Acids

We, Kyowa Hakko Kogyo co., Ltd., hereby confirm that qualities of Kyowa Hakko's products listed below are so high, and we consider that Kyowa Hakko's products listed below are safe and permitted to be used as food ingredient.

List of Products;

L-ALANINE
L-ASPARTIC ACID
L-CITRULLINE
L-GLYCINE
L-HISTIDINE
L-PROLINE
L-SERINE

If you have questions or further requirement, please feel free to contact us.

Sincerely yours;

Shigeru Chiba, Manager
Quality Assurance Department
Bio-Chemicals Business Unit
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

ANNEXE 7

FORMULAIRE DE DECLARATION D'UN EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (EIG) SUSCEPTIBLE D'ETRE DU A UNE RECHERCHE BIOMEDICALE SUR UN MEDICAMENT OU PRODUIT ASSIMILE

ASSISTANCE PUBLIQUE  HÔPITAUX DE PARIS



PARTIE RESERVEE AU PROMOTEUR : NE PAS REMPLIR

____ - ____ - DRCD - ____ - ____ - ____

Cette fiche doit être retournée dûment complétée recto-verso au DRCD par **fax** : +33 (0)1 44 84 17 99
A l'attention de « Aurélie Guimfack » et de « Christine Lanau »

Date de notification :

____ ____
jj mm aaaa

Code de la Recherche : P _____

N° EudraCT : _____

Déclaration initiale ☐ Suivi d'EIG déclaré ☐

Titre de la Recherche Biomédicale : « titre en entier » - « titre en abrégé s'il y a lieu »

1) Nom et adresse du centre : _____

Centre n° : ____ Investigateur (Qualité - Nom - Prénom) : _____

2) Identification du patient :

Nom : ____ Prénom : ____
N° Randomisation: ____
(N° Centre + N° de demande de randomisation)
Sexe : Masculin ☐ Féminin ☐
Date de naissance : ____
Age : ____ ans
Poids : ____ kg
Taille : ____ cm
Date de signature du consentement : ____
Date du résultat de la randomisation : ____

3) Evénement indésirable grave :

Décès ☐
Mise en jeu du pronostic vital ☐
Nécessite ou prolonge l'hospitalisation : ☐
Du ____ au ____ ☐ en cours
Incapacité ou invalidité ☐
Anomalie congénitale ☐
Autre(s) critère(s) médicalement significatif(s) (préciser) : ☐

Antécédents (allergie, insuffisance rénale ...) : _____

4) Description complète de l'événement indésirable (diagnostic retenu, localisation anatomique, critères permettant de considérer l'événement comme grave) :

Intensité : Légère ☐ Modérée ☐ Sévère ☐

Date de survenue : ____ et heure de survenue : ____
jj mm aaaa hh min

Délai de survenue après la dernière prise : _____

5) Médicament(s) expérimental(aux) administré(s) avant la survenue de l'événement indésirable :

Nom commercial (de préférence) ou Dénomination Commune Internationale	Voie	Dose/ 24h	Date de début	En cours	Date de fin	Indication	Causalité * (1,2,3 ou 4)
			____	<input type="checkbox"/>	____		
			____	<input type="checkbox"/>	____		
			____	<input type="checkbox"/>	____		
			____	<input type="checkbox"/>	____		

* 1 = Probable 2 = Possible 3 = Non liée 4 = Inconnue

6) Médicament(s) concomitant(s) à l'exclusion de ceux utilisés pour traiter l'événement indésirable :

Nom commercial (de préférence) ou Dénomination Commune Internationale	Voie	Dose/ 24h	Date de début	En cours	Date de fin	Indication	Causalité * (1,2,3 ou 4)
				<input type="checkbox"/>			
				<input type="checkbox"/>			
				<input type="checkbox"/>			
				<input type="checkbox"/>			

* 1 = Probable 2 = Possible 3 = Non liée 4 = Inconnue

7) Evolution (indiquez si des mesures symptomatiques ont été prises : non ☐ oui ☐ Si oui, préciser) :

8) Date de disparition : et heure de disparition :

9) Autre(s) étiologie(s) envisagée(s) : non ☐ oui ☐ Si oui, préciser :

10) Examen(s) complémentaire(s) réalisé(s) : non ☐ oui ☐ *Si oui, préciser date, nature et résultats :*

11) Traitements de la Recherche Biomédicale :

Levée d'insu : non ☐ oui ☐ non applicable ☐ date : |__| |__| |__| |__| |__| |__|

Résultat de la levée d'insu : _____

Ré-administration du (des) médicament(s) : non ☐ oui ☐ non applicable ☐ date : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|

Si oui, le(s)quel(s) : _____

Récidive après ré-administration : non ☐ oui ☐ non applicable ☐ date :

12) Selon l'investigateur, l'événement indésirable grave semble plutôt lié :

☐ au(x) médicament(s) de la recherche : le(s)quel(s) : _____ ☐ à une maladie intercurrente
☐ au(x) médicament(s) concomitant(s) : le(s)quel(s) : _____ ☐ à la progression de la maladie
☐ aux procédures de la recherche biomédicale ☐ autre : _____

Date : Tampon du service : _____ Nom : _____ Signature : _____

PARTIE RESERVEE AU PROMOTEUR : NE PAS REMPLIR

Numéro d'identification de l'événement : EV | | | |

Date de réception par le promoteur : / /

Date de ce rapport :

--	--	--	--	--	--	--	--

☐ initial ☐ suivi n° | | |

Selon le promoteur, l'événement indésirable semble plutôt lié :

☐ au(x) médicament(s) de la recherche : le(s)quel(s) : _____ ☐ à une maladie intercurrente
☐ au(x) médicament(s) concomitant(s) : le(s)quel(s) : _____ ☐ à la progression de la maladie
☐ aux procédures de la recherche biomédicale ☐ autre : _____

Si selon le promoteur, l'événement semble plutôt lié au médicament :

☐ L'événement indésirable grave est attendu ☐ L'événement indésirable grave est inattendu

Commentaires du promoteur :

Nom et qualité du représentant du promoteur : _____ **Signature :** _____

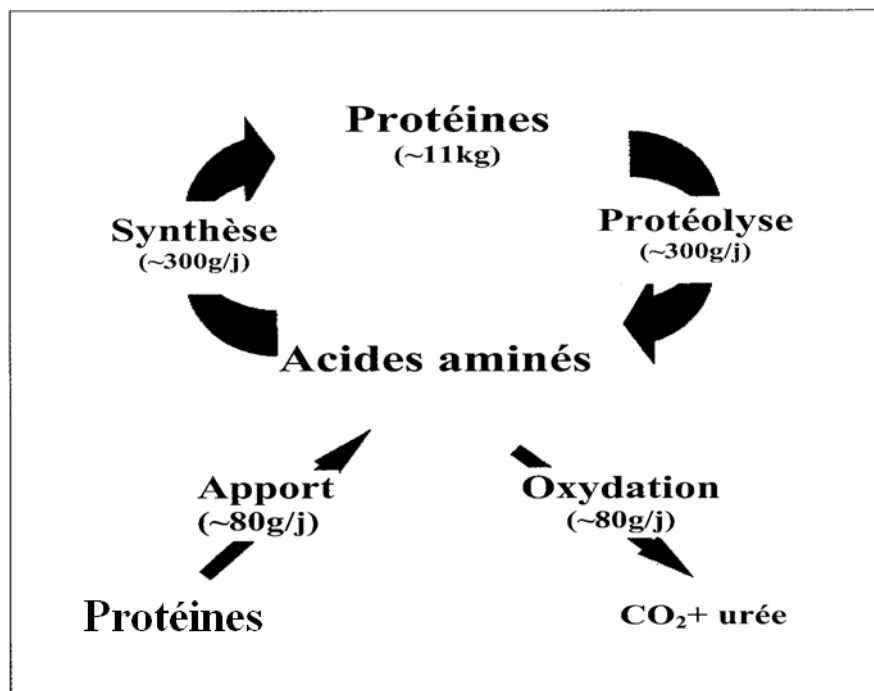


Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme protéique du corps entier chez l'Homme adulte sain (Beaufrère, 2002).

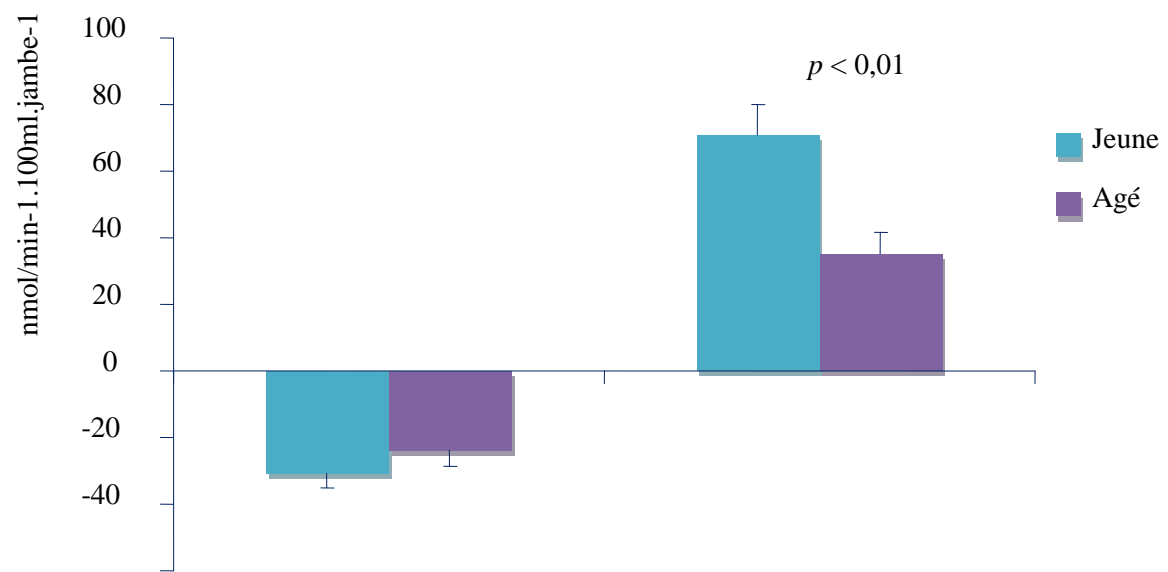


Figure 2 : Bilan net de phénylalanine à l'état postprandial chez l'adulte jeune ou âgé (Volpi *et al.*, 1998).

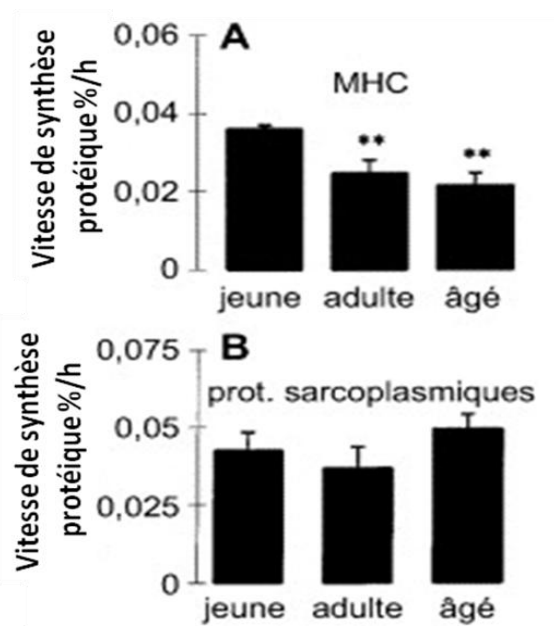


Figure 3 : Vitesses fractionnelles de synthèse de protéines musculaires estimées au cours de trois périodes de la vie. Sont évaluées les synthèses de protéines de contraction (chaînes lourdes de la myosine, MHC, A ou sarcoplasmiques, B). Différence significative *versus* les mesures réalisées dans le groupe de sujets jeunes, ** $p < 0,01$ (Balagopal *et al.*, 1997b).

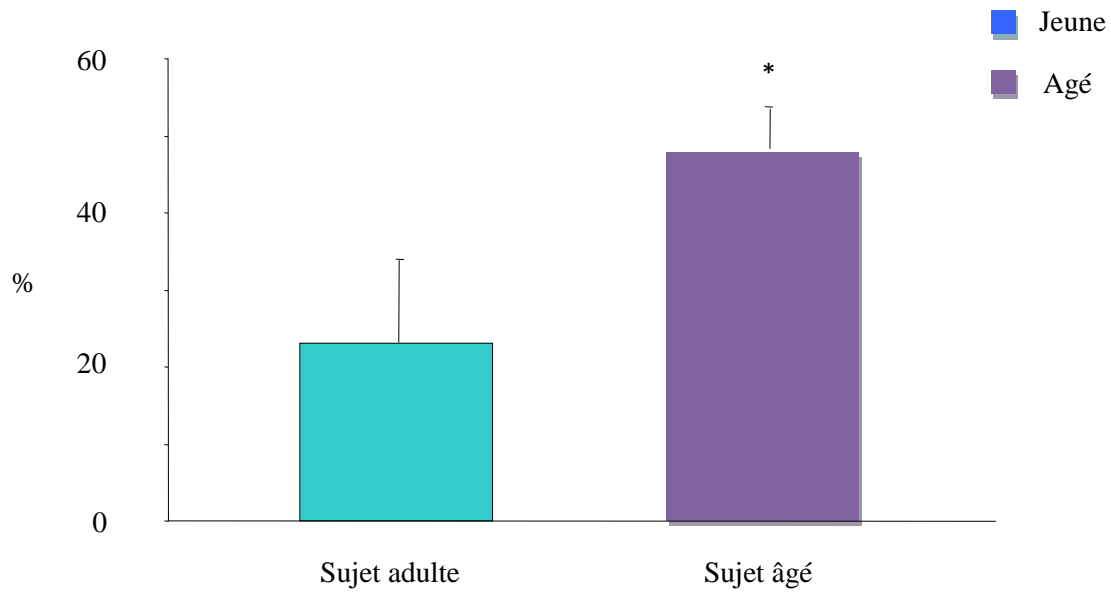


Figure 4 : Séquestration splanchnique des acides aminés : l'extraction de leucine est deux fois plus élevée dans l'aire splanchnique chez le sujet âgé (* $p < 0,05$) (Boirie *et al.*, 1997).

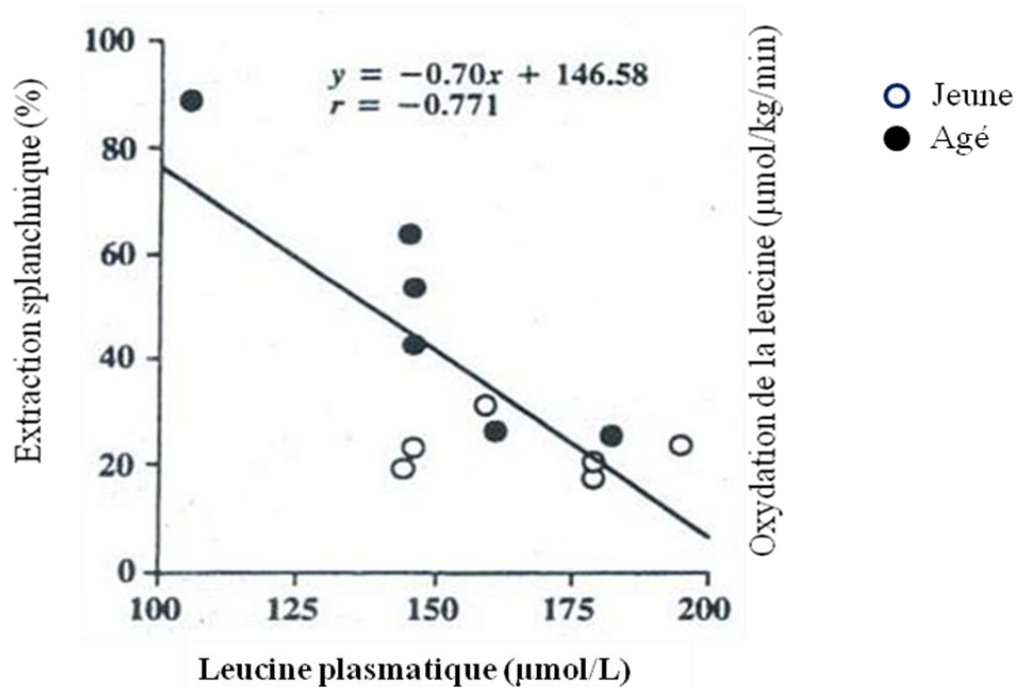
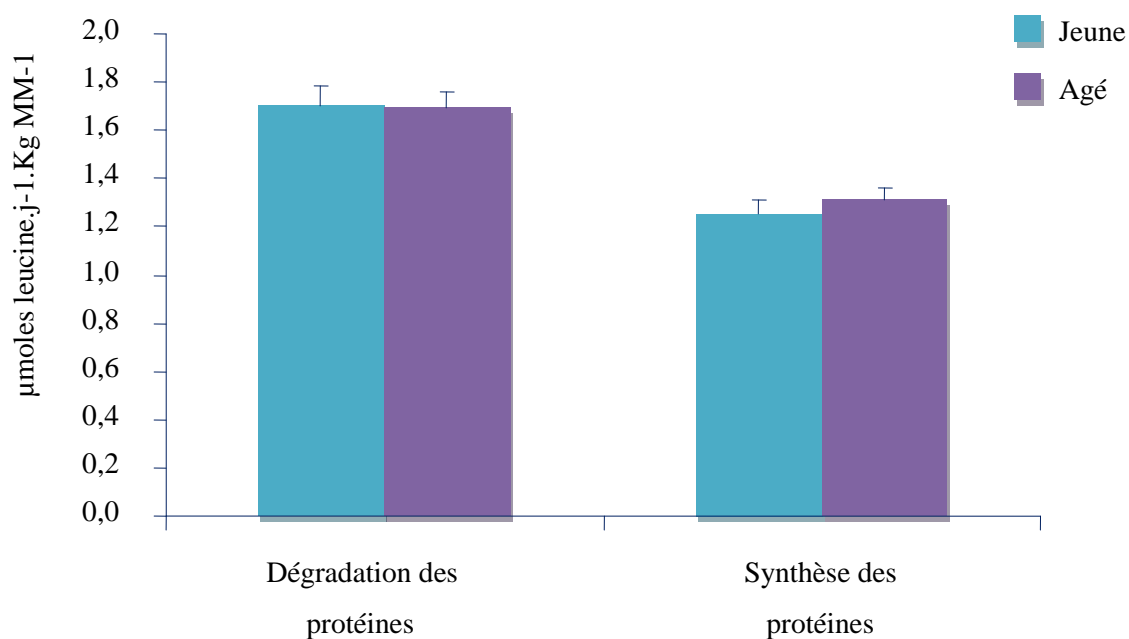
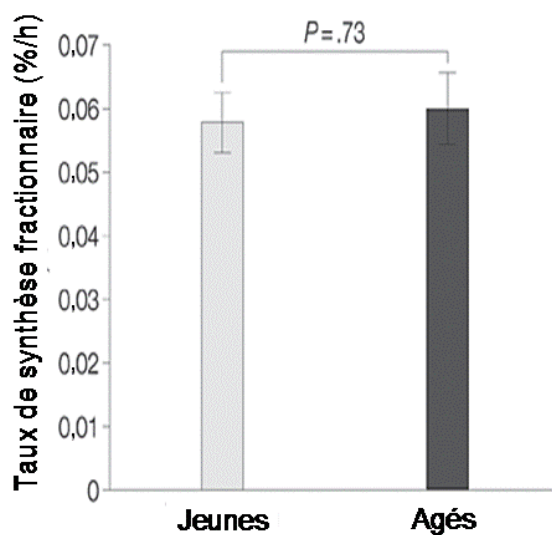


Figure 5 : Relation entre l'extraction splanchnique de leucine et la concentration plasmatique de leucine chez l'adulte jeune ou âgé (Boirie *et al.*, 1997).



6a : Comparaison entre sujets jeunes et sujets âgés de la synthèse et de la dégradation protéiques absolues, corps entier, à l'état post-absorptif (Boirie *et al.*, 1997).



6b : Comparaison entre sujets jeunes et sujets âgés de la synthèse protéique fractionnaire au niveau musculaire, à l'état post-absorptif (Volpi *et al.*, 2001).

Figures 6 : A l'état post-absorptif, le *turn-over* protéique n'est pas modifié entre sujets âgés et jeunes ; il ne permet pas d'expliquer la perte de masse musculaire.

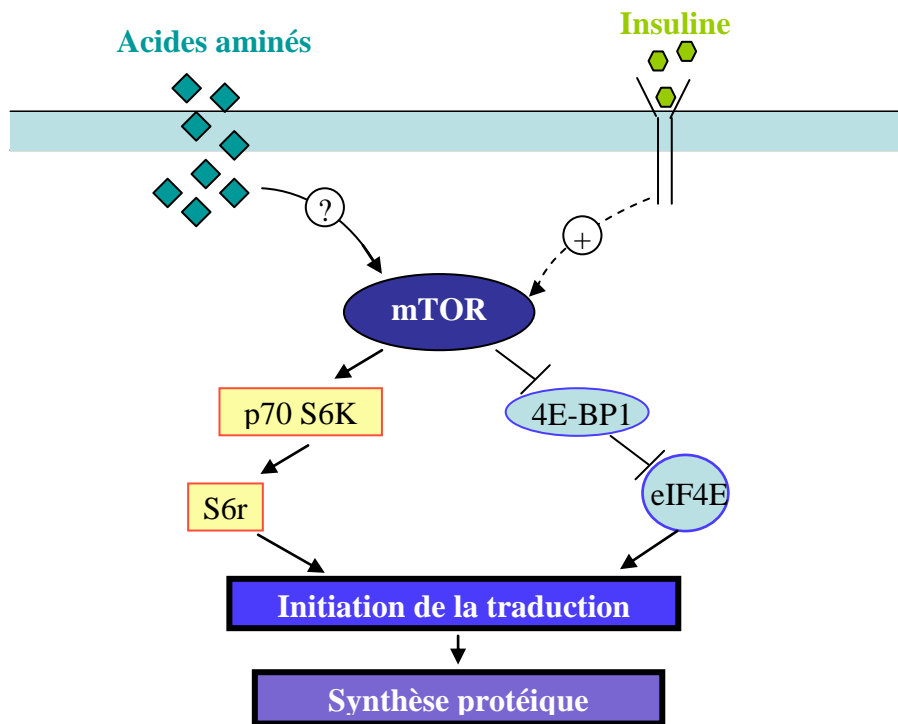


Figure 7 : La voie de transduction mTOR correspond à plusieurs étapes, essentiellement d'auto-phosphorylation de protéines.

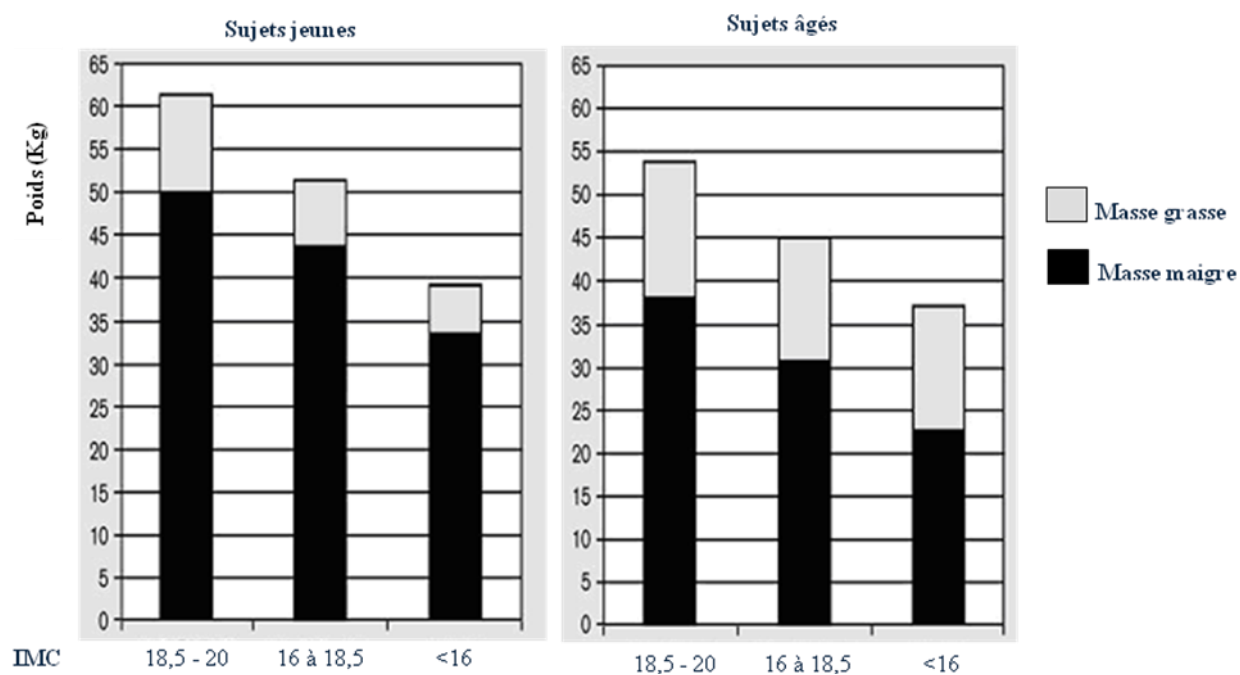


Figure 8 : Composition corporelle de sujets dénutris en fonction de l'âge (Hébuterne *et al.*, 2001).

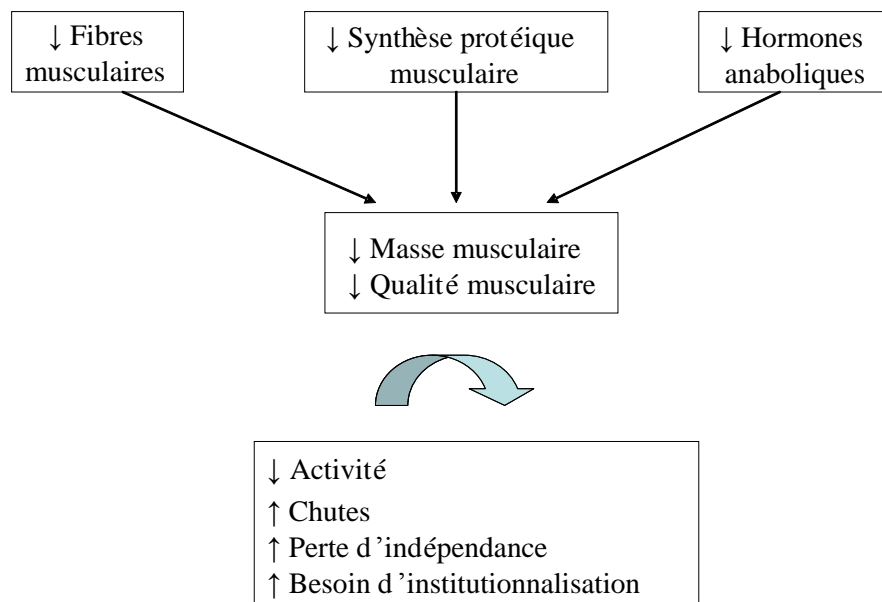
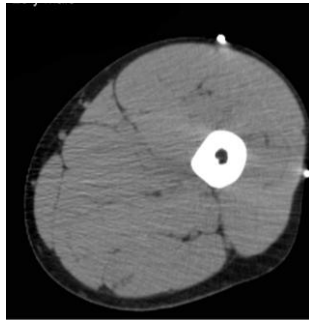
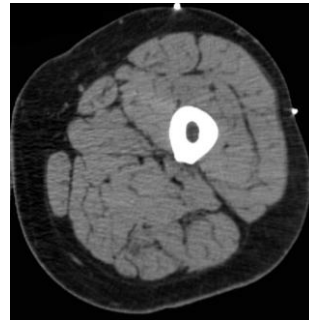


Figure 9 : Causes et conséquences de la sarcopénie (Greenlund et Nair, 2003).



Homme de **25 ans**



Homme de **81 ans**

Figure 10 : Scan d'une tomographie computerisée du milieu de la cuisse chez des sujets jeunes (à gauche) et âgés (à droite) (Koopman et van Loon, 2009).

Tableau 1 : Réduction, exprimée en pourcentage, de la taille des fibres musculaires de sujets âgés (Butler-Browne et Bigard, 2006).

	Âge (ans)	Pourcentage de variation (%) âgés/jeunes	
		Fibres type I	Fibres de type II
Larsson et coll. (1978)	22–65	-1	-25
Essen-Gustavsson et Borges (1986)	22–70	-15	-19
Lexell et coll. (1988)	15–83	-1	-29
Hikida et coll. (2000)	58–78	-24	-40
Fiatarone Singh et coll., (1999)	72–98	+7	-60

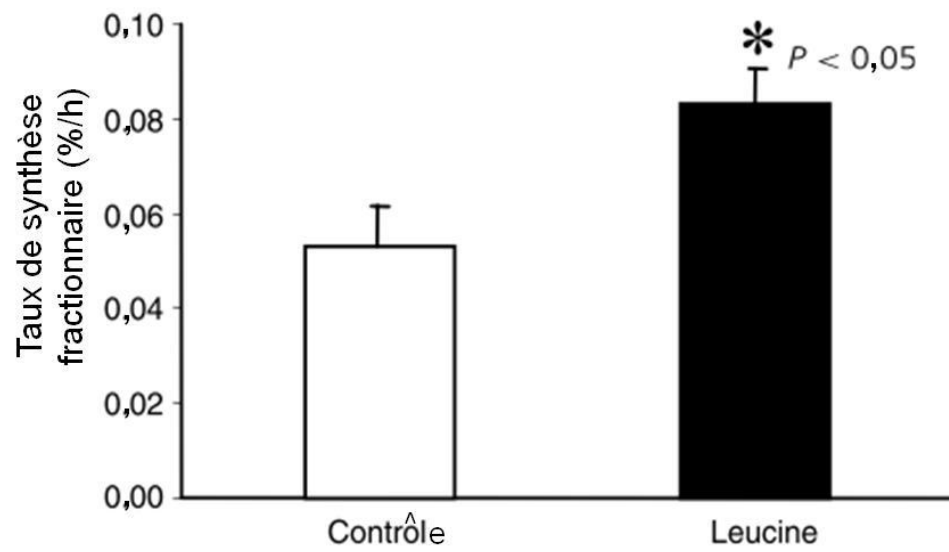


Figure 11 : La leucine stimule la synthèse protéique musculaire chez les personnes âgées (Rieu *et al.*, 2006).

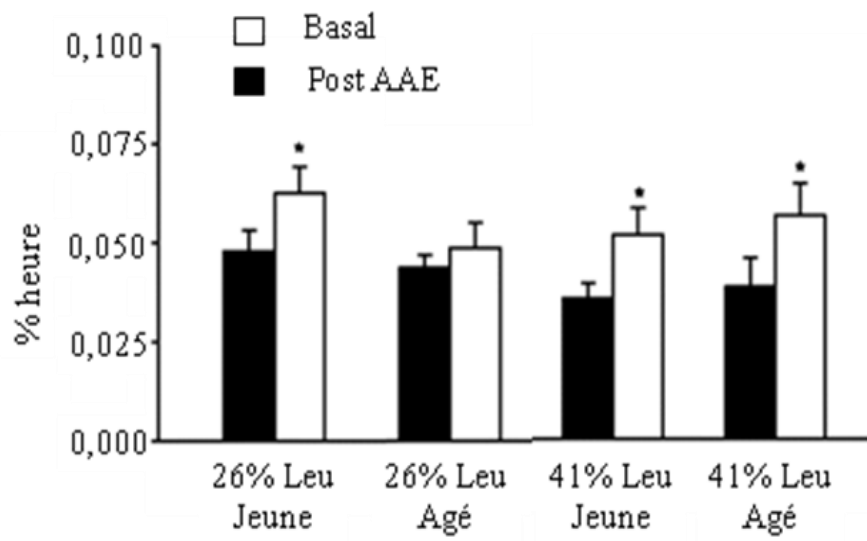


Figure 12 : Une grande quantité de leucine est nécessaire à la stimulation optimale de la synthèse protéique musculaire chez la personne âgée (Katsanos *et al.*, 2006).

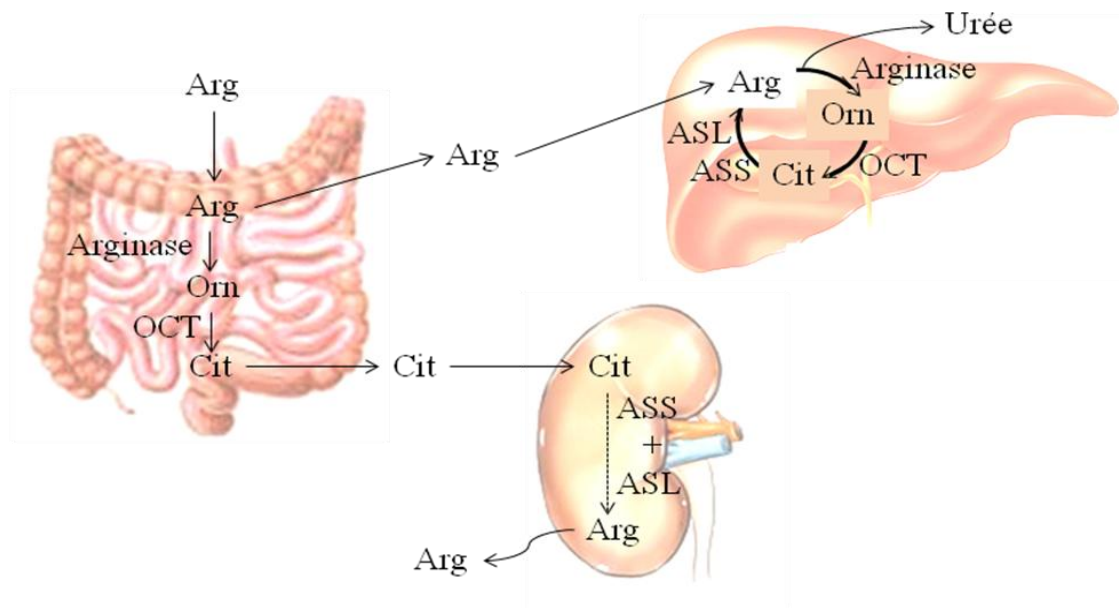


Figure 13 : Cycle inter-organe Arg-Cit-Arg

OCT : ornithine carbamoytransferase ; Arg : arginine; Cit : citrulline ; Orn : ornithine ;
ASS+ASL : argininosuccinate synthetase + lyase.

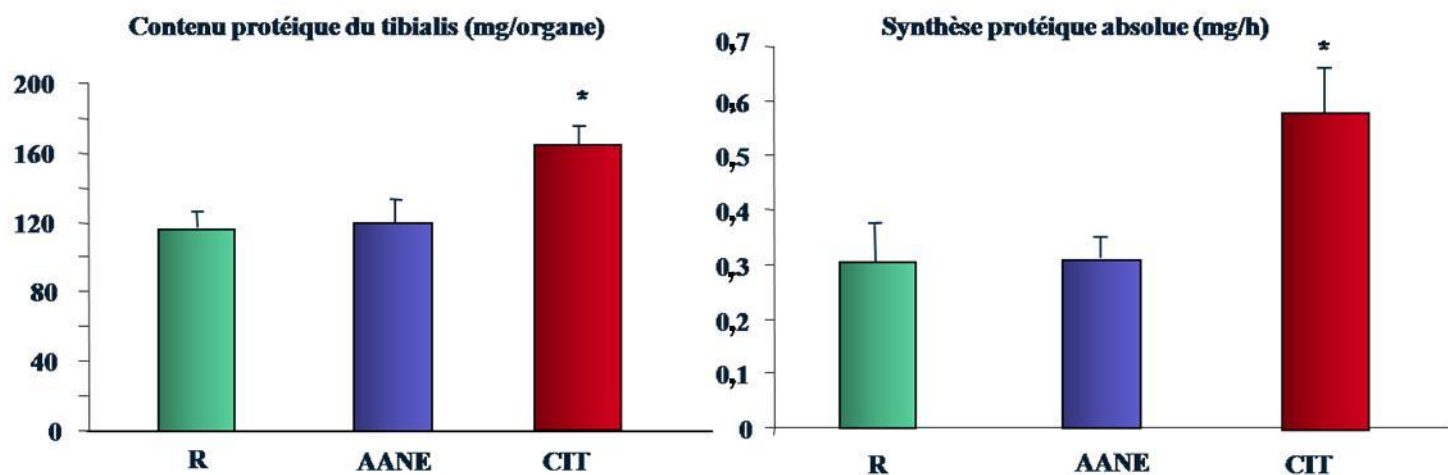


Figure 14 : Contenu protéique et synthèse protéique absolue du tibialis de rats âgés dénutris
ANOVA + test de Duncan : * $p < 0,05$ vs AANE et R (Osowska *et al.*, 2006).

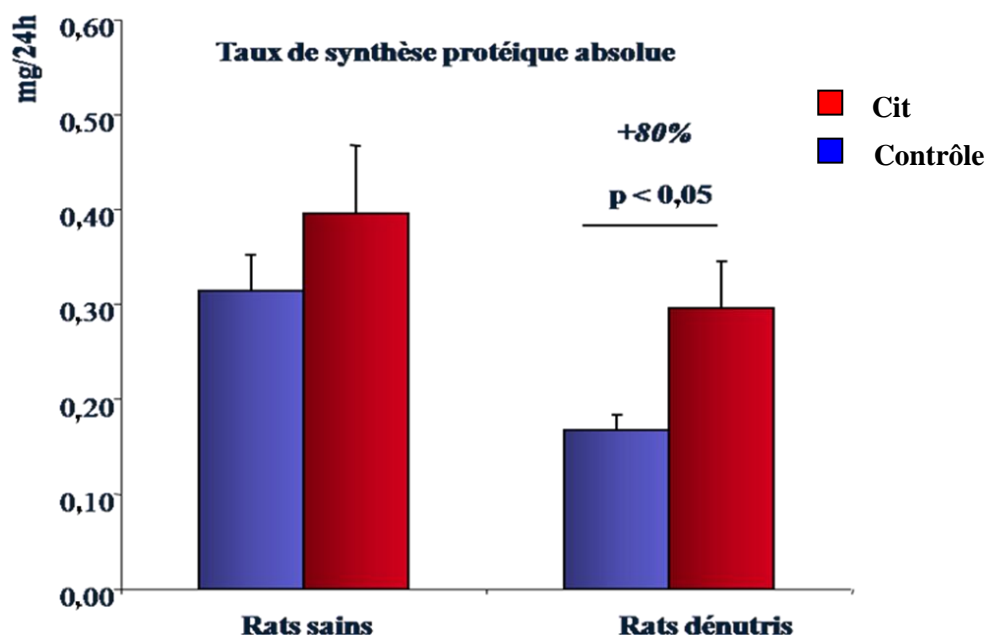


Figure 15 : Effet direct de la citrulline sur des muscles isolés incubés ; ANOVA+PLSD de Fischer ; Effet de la dénutrition : $p < 0,05$, effet de la citrulline : $p < 0,05$ (Moinard *et al.*, 2007a).

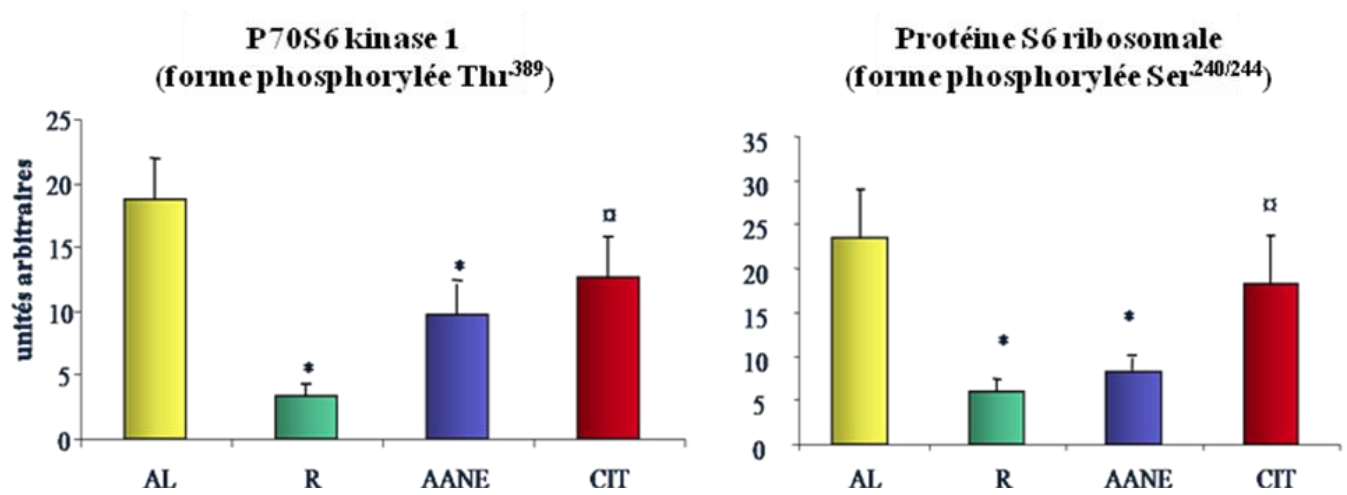


Figure 16 : Stimulation de la synthèse protéique musculaire de la Citrulline via la voie mTOR, chez des rats âgés dénutris : * vs AL, $p < 0,05$; α vs R, $p < 0,05$ (Moinard *et al.*, 2007b).

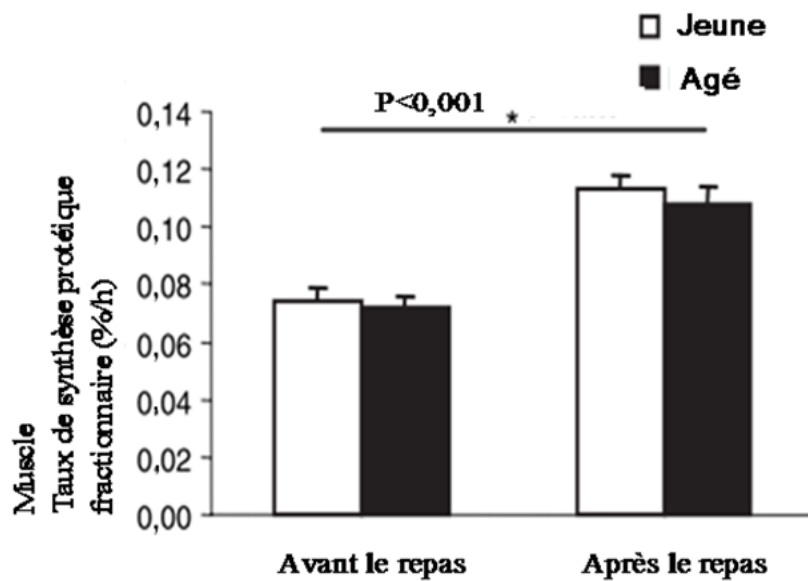


Figure 17 : La réponse anabolique à l'ingestion d'une quantité importante de protéines (110 g de viande rouge) est conservée chez la personne âgée (Symons *et al.*, 2007).

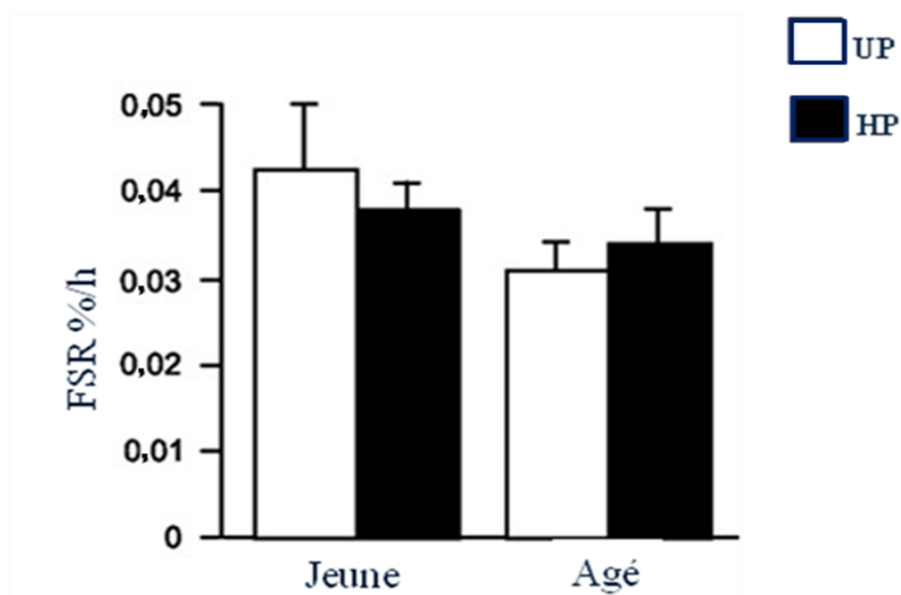


Figure 18 : Taux de synthèse protéique musculaire. UP, régime protéique habituel; HP, régime hyperprotéique; FSR, taux de synthèse fractionnaire (Walrand *et al.*, 2008).

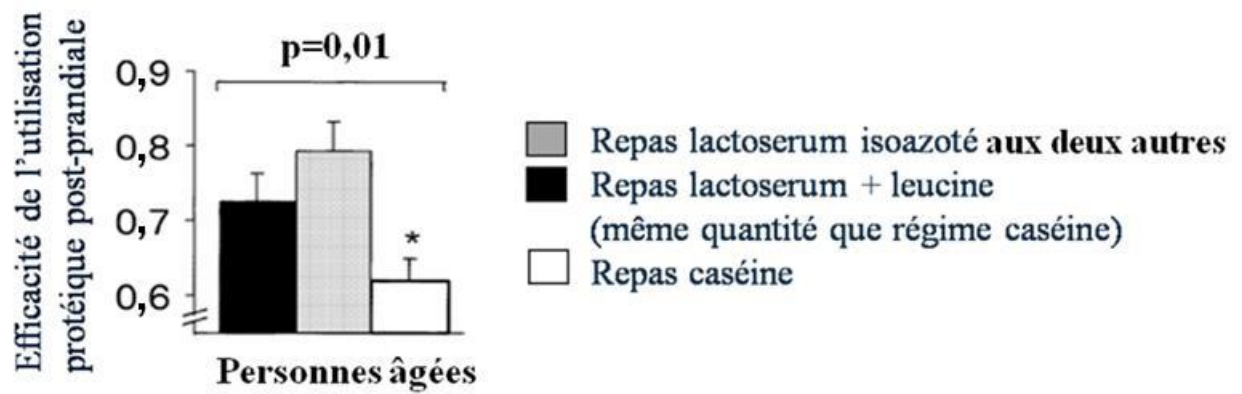


Figure 19 : Le taux de digestion des protéines affecte directement leur utilisation chez les personnes âgées (Dangin *et al.*, 2003).

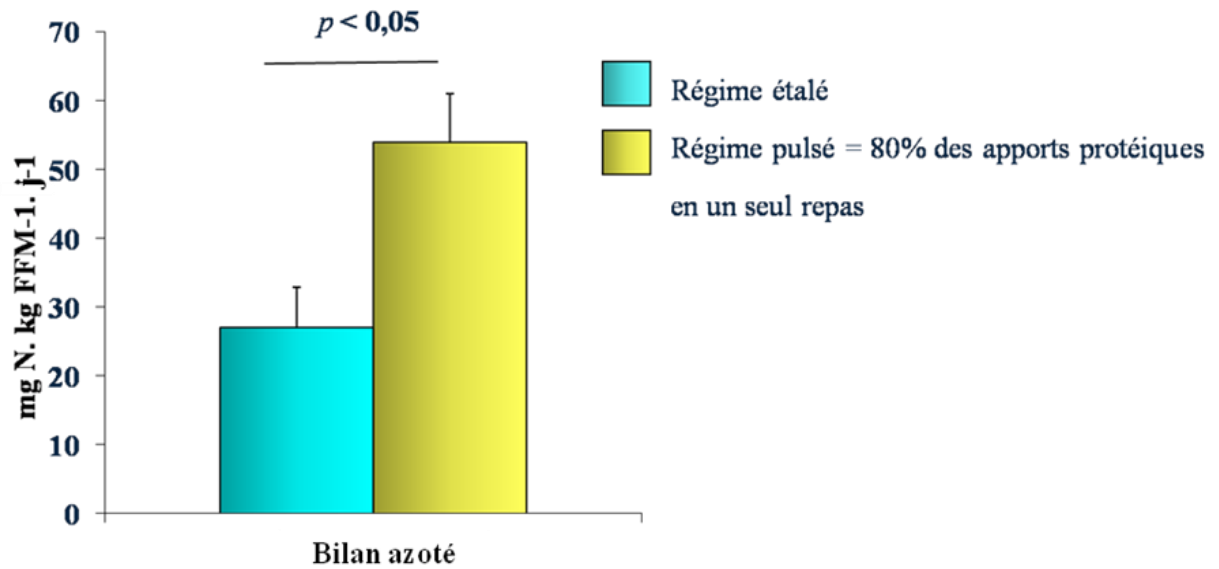


Figure 20 : Amélioration de la balance azotée par un régime pulsé chez les femmes âgées (15 femmes en bonne santé, âgées de 68 ans en moyenne ; durée de l'étude 14 jours) (Arnal *et al.*, 1999).

Tableau 2 : Modifications de la composition corporelle après 6 semaines d'un apport protéique pulsé ou étalé sur la journée (Bouillanne *et al.*, 2009).

	Hommes (n = 14)		Femmes (n = 36)		<i>p</i> ²	
	Régime étalé (n = 9)	Régime pulsé (n = 5)	Régime étalé (n = 18)	Régime pulsé (n = 18)	Sexe	Régime
Masse musculaire squelettique appendiculaire (kg)	0,24 [-0,46; 0,94]	0,83 [-1,62; 3,28]	- 0,49 [-1,37; 0,40]	0,77 [0,09; 1,44] *	0,50	0,02
Masse maigre (kg)	0,34 [-1,16; 1,85]	1,07 [-0,21; 2,34]	- 0,95 [-2,11; 0,20]	1,16 [0,03; 2,30] *	0,47	<0,01

¹ moyenne et intervalle de confiance à 95%

² ANOVA à deux facteurs

* modification significative

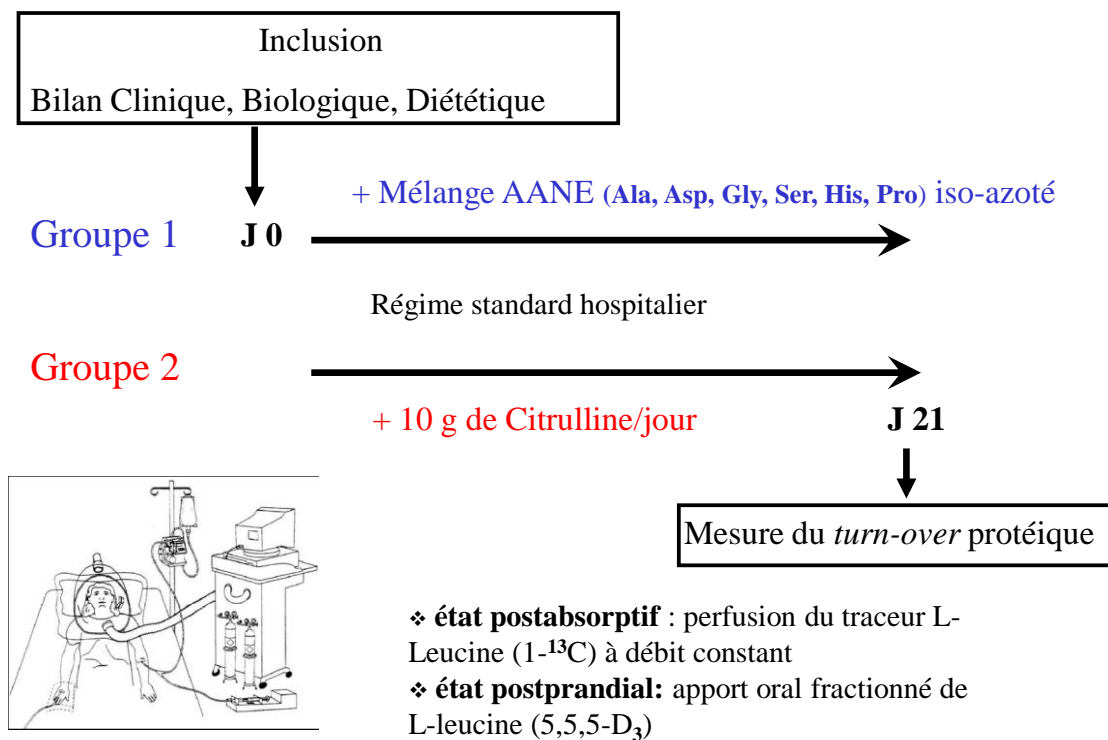


Figure 21 : Schéma de l'étude CIPROAGE

Résumé

La dénutrition protéino-énergétique, qui touche une partie de la population âgée, accentue leur déclin musculaire (sarcopénie et dynapénie) et participe donc à l'augmentation de la morbi-mortalité. La prévention et le traitement de la dénutrition s'avèrent difficiles, liés au défaut de réponse à la renutrition observé chez les personnes âgées ; celui-ci est expliqué par une forte extraction splanchnique des acides aminés en période post-prandiale, responsable d'une moindre stimulation de la protéosynthèse musculaire. La citrulline, acide aminé non protéinogène qui échappe à la séquestration splanchnique des acides aminés, est un facteur stimulant de la synthèse protéique musculaire. Nous avons montré qu'un apport en citrulline s'accompagne d'une amélioration de la masse et des capacités fonctionnelles musculaires (activité motrice, force musculaire maximale isométrique) chez le rat âgé dénutri. Cet effet bénéfique de la citrulline s'expliquerait, en partie, par une surexpression des protéines contractiles myofibrillaires et une diminution de l'expression d'éléments des voies de dégradation protéique. Son mécanisme d'action reste encore à préciser bien que nos données suggèrent également une réorientation du métabolisme énergétique. En complément de ces données expérimentales, nous développons une étude clinique afin de vérifier les effets bénéfiques de la citrulline sur le métabolisme protéique de la personne âgée dénutrie. Suite à cette étude, nous pourrions réaliser un essai thérapeutique de plus grande ampleur, afin de montrer l'efficacité de la citrulline sur l'amélioration de paramètres reflétant la fonction musculaire. Ainsi, l'administration de citrulline pourrait être une stratégie nutritionnelle efficace et innovante afin de limiter le déclin musculaire survenant au cours du vieillissement. En s'opposant à la dénutrition protéino-énergétique des personnes âgées, elle pourrait retarder l'entrée dans la dépendance, améliorer la qualité de vie et limiter la morbi-mortalité liée à la dynapénie.